QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON NERVE GROWTH FACTOR: SYNTHESE IN ZIELORGANEN DES PERIPHEREN NERVEN-SYSTEMS UND RETROGRADER AXONALER TRANSPORT

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Sigrun Korsching

1984

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON NERVE GROWTH FACTOR : SYNTHESE IN ZIELORGANEN DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS UND RETROGRADER AXONALER TRANSPORT

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Sigrun Korsching
aus Göttingen

Dissertation eingereicht am 11. 1. 1984

1. Gutachter : Prof. Dr. H. Thoenen
2. Gutachter : Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 5. 3. 1984

Li und Horst
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. H. Thoenen in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie durchgeführt.

Prof. H. Thoenen danke ich für die intensive Betreuung der Arbeit.
Dr. G. Harper danke ich für die bereitwillige Überlassung der monoklonalen Antikörper.
W. Nadler und Dr. H. Rohrer danke ich für anregende Diskussionen.
Frau A. Brandhofer und Frau F. Scholz-Marb danke ich für ihre qualifizierte Unterstützung bei den Zellkulturarbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

1. **Zusammenfassung**.....1
2. **Einleitung**.....3
3. **Methoden**.....6
3.1. Materialien und Lösungen.....6
3.2. Reinigung polyklonaler Antikörper.....8
3.3. Produktion und Reinigung monoklonaler Antikörper.....9
3.4. Proteinbestimmung.....10
3.5. Messung der Galaktosidaseaktivität.....10
3.6. Jodierung.....12
3.7. Doppelseitige Immunodiffusion.....12
3.8. Affinitätsbestimmung der Antikörper.....13
3.9. Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten.....14
3.10. Protein A-Radioimmuntest.....16
3.11. Agarosegel-Elektrophorese.....16
3.12. Kovalente Bindung von Antikörpern an Polystyrol.....17
3.13. Kopplung von ß-Galaktosidase an Antikörper.....18
3.14. Ligatur des Ischiasnervs.....19
3.15. Sialektomie.....19
3.16. Zerstörung sympathischer Nervenendigungen mit 6-OH-Dopamin.....20
3.17. Blockade des axonalen Transports mit Colchicin.....21
3.18. Messung der biologischen Aktivität von NGF.....22
4. **Ergebnisse**.....23
4.1. Entwicklung des Enzymimmuntests für NGF.....23
4.1.1. Produktion und Reinigung der Antikörper.....24
4.1.2. Immobilisierung des ersten Antikörpers.....26
4.1.3. Kopplung von ß-Galaktosidase an den zweiten Antikörper.....42
4.1.4. Optimierung des EIT.....47
4.1.5. Standardbedingungen im EIT.....53
4.1.6. Spezifität des EIT.....55
4.1.7. Messung von NGF in Geweben und Blut.....56
4.2. Anwendung des Enzymimmuntests.....59
4.2.1. NGF-Gehalt in Organen von Ratte und Maus.....59
4.2.2. Mechanische Blockade des axonalen Transports im Ischiasnerv.....64
4.2.3. Blockade des retrograden axonalen Transports im sympathischen Nervensystem durch 6-OH-Dopamin.....69
4.2.4. Systemische Blockade des axonalen Transports mit Colchicin.....74
5. **Diskussion**.....76
5.1. Entwicklung des Enzymimmuntests für NGF.....76
5.2. Vorkommen, Synthese und Transport von NGF.....84
6. **Literatur**.....92

Liste der Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
EIT	Enzymimmuntest
Gal	ß-Galaktosidase
IgG	Immunoglobulin
K_D	Dissoziationskonstante
MU	4-Methylumbelliferon (7-Hydroxy-4-methyl-chromen-2-on)
MUG	4-Methylumbelliferyl-ß-D-Galaktosid
NGF	Nerve Growth Factor
SaNGF	Schaf-antiNGF-Antikörper
SCG	Oberes Zervikalganglion
SEM	Standardabweichung des Mittels (durchgehend verwendet)
S/R	Signal/Rausch-Verhältnis
U	Einheit der Enzymaktivität (µmol Produkt/min)

H-Puffer	Zusammensetzung s. 3.1.
PBS	Zusammensetzung s. 3.1.
R-Puffer	Zusammensetzung s. 3.1.
T-Puffer	Zusammensetzung s. 3.1.
W-Puffer	Zusammensetzung s. 3.1.

1. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative Nachweismethode für Nerve Growth Factor (NGF) entwickelt, die frei von den Artefakten früherer Methoden ist und die erforderliche hohe Sensitivität besitzt, um den physiologisch relevanten endogenen NGF-Gehalt messen zu können.

Die Methode besteht aus einem zweiseitigen Enzymimmuntest (EIT), bei dem NGF an monoklonale und affinitätsgereinigte polyklonale antiNGF-Antikörper gebunden wird, die ihrerseits kovalent an Glaskugeln gekoppelt sind. Der gebundene NGF wird mit dem zweiten, an ß-Galaktosidase gekoppelten Antikörper nachgewiesen, indem das fluoreszierende Reaktionsprodukt der ß-Galaktosidase gemessen wird. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde eine Nachweisgrenze von 5 pg NGF/ml (0.01 fmol/Test) für monoklonale und 10 pg NGF/ml (0.02 fmol/Test) für polyklonale Antikörper erreicht. In Gewebe war die Nachweisgrenze 0.05-0.3 ng NGF/g Feuchtgewicht (organabhängig). Die Recovery von NGF, der Homogenaten zugesetzt wurde, betrug 40-100%, abhängig vom untersuchten Gewebe.

Mit diesem EIT wurde der NGF-Gehalt von neuronalem Gewebe und innervierten Organen untersucht. Sympathische Ganglien von Ratten enthielten 19-25 ng NGF/g Feuchtgewicht (Stellarganglion und oberes Zervikalganglion), die sensorischen Ganglien 0.5-3.0 ng/g (Trigeminalganglion und Spinalganglien). Die dorsalen Wurzeln der Spinalganglien wiesen weniger als 2% des NGF-Gehalts der Spinalganglien auf. Sympathisch dicht innervierte Organe (Speicheldrüse, Herzvorhof, Iris und Samenleiter) enthielten 0.5-2.1 ng NGF/g Feuchtgewicht, die weniger dicht innervierten Organe (Leber und Herzventrikel) 0.13-0.25 ng/g, während im fast nicht sympathisch innervierten Skelettmuskel kein NGF gefunden wurde (<0.1 ng/g). Im Herzvorhof und -ventrikel der Maus betrug der NGF-Gehalt 3.3 und 1.3 ng NGF/g Feuchtgewicht, im Skelettmuskel der Maus wurde kein NGF gefunden

(<0.3 ng NGF/g Feuchtgewicht). Der NGF-Gehalt im Blut lag bei der Ratte unter der Nachweisgrenze (<0.05 ng/ml), bei der Maus betrug er 0.04 und 0.10 ng NGF/ml (weibliche bzw. männliche Tiere).

Die mechanische Blockade des axonalen Transports im Ischiasnerv der Ratte führte distal der Ligatur zur linear zeitabhängigen Akkumulation von NGF innerhalb der ersten 12 h auf maximal das 13fache des Kontrollwertes. Auf der proximalen Seite sank der NGF-Gehalt bis zur bzw. unter die Nachweisgrenze (20% des Kontrollwertes). Aus dem Zeitverlauf der Akkumulation wurde eine Transportrate von 2 mm/h für endogenen NGF berechnet.

Die Blockade des retrograden axonalen Transports im gesamten sympathischen Nervensystem durch 6-OH-Dopamin führte zu einer zeitabhängigen Akkumulation von NGF in den sympathisch innervierten Organen auf maximal das 3-4fache des Kontrollwertes nach 2 Tagen. Der NGF-Gehalt in den sympathischen Ganglien sank innerhalb eines Tages auf 3% des Kontrollwertes. Daraus wurde eine Halbwertszeit von ungefähr 5 h für die Degradation von NGF abgeschätzt.

Die Schlußfolgerungen aus diesen Daten sind :

- NGF ist **in vivo** im ng/g-Bereich vorhanden, wobei die Menge in den Endorganen mit der sympathischen Innervationsdichte korreliert ist.
- Endogener NGF unterliegt retrogradem axonalen Transport in peripheren Nerven.
- Im intakten Organismus wird NGF nur in den innervierten Organen synthetisiert, nicht aber in den Nerven oder Ganglien.

Diese Ergebnisse bestätigen das Modell von NGF als einem lokal in den innervierten Organen synthetisierten, trophischen Faktor, der nach retrogradem axonalen Transport in den sympathischen und sensorischen Ganglien seine charakteristischen biologischen Wirkungen ausübt.

2. EINLEITUNG

Den vielfältigen Aufgaben, die das Nervensystem in der Informationsverarbeitung und der Steuerung erfüllt, entspricht die Komplexität seines inneren Aufbaus. Auf welche Weise die dazu notwendige regionale Spezifität der Nervenbahnen und Verschaltungen zustandekommt und aufrechterhalten wird, ist bisher erst in Ansätzen bekannt. Retrograde Beeinflussung (Rückkopplung) durch die innervierten Organe stellt dabei einen wichtigen Mechanismus dar (vgl. Hamburger 1977). Diese Rückkopplung kann in einer trophischen Wirkung der innervierten Organe bestehen, die auf die 'richtigen' Neuronen beschränkt ist.

Ein wichtiger Kandidat für einen Faktor mit trophischem Einfluß ist das Protein Nerve growth factor (NGF). Dieses Protein ist bisher der einzige neurotrophe Faktor, der chemisch und biologisch gut charakterisiert ist (vgl. Thoenen und Barde 1980). NGF wurde zuerst aus der Speicheldrüse der Maus isoliert (Cohen 1960), wird aber auch in anderen Organen wie Giftdrüsen von Schlangen und Geschlechtsanhangdrüsen von Meerschweinchen, Kaninchen, Rind, Schaf und Ziege in großen Mengen gefunden (Cohen und Levi-Montalcini 1956, Harper und Thoenen 1980). Einige Beobachtungen (vgl. Thoenen und Barde 1980) sprechen dafür, daß dieses Vorkommen in sekretorischen Organen nichts mit der neurotrophen Wirkung dieses Moleküls zu tun hat, die durch folgende Beobachtungen charakterisiert ist:

- Der Entzug von endogenem NGF durch Antikörper (Immunosympathektomie) führt pränatal zur Degeneration einer Subpopulation der sensorischen Neuronen, in der frühen postnatalen Phase zur Zerstörung des gesamten sympathischen Nervensystems. Adulte sympathische Neuronen reagieren durch verminderte Transmittersynthese (vgl. Harper und Thoenen 1981).

- Durch hohe Dosen von NGF wird der in der normalen Entwicklung stattfindende Zelltod von der Hälfte aller sympathischen und sensorischen Neuronen vollständig verhindert und die Transmitter-synthetisierenden Enzyme Tyrosinhydroxylase und Dopamin-ß-hydroxylase werden spezifisch induziert (vgl. Thoenen und Barde 1980).

- Sympathische Neuronen und eine Subpopulation der sensorischen Neuronen besitzen spezifische Rezeptoren für NGF, im Gegensatz etwa zu Motoneuronen. Exogener, radioaktiv markierter NGF wird internalisiert und retrograd zum Zellkörper transportiert. Die Blockade des retrograden axonalen Transports führt in frühen Entwicklungsstadien ebenso wie die Immunosympathektomie zur Degeneration der betroffenen sympathischen und sensorischen Neuronen (vgl. Schwab und Thoenen 1983, Otten et al. 1983).

Anhand dieser Beobachtungen wurde die Vorstellung entwickelt, daß NGF in Zielorganen des sympathischen und sensorischen Nervensystems synthetisiert wird, von den innervierenden Neuronen aufgenommen und zum Zellkörper transportiert wird, wo entweder NGF selbst oder ein mittransportierter Second Messenger seine Wirkung ausübt. NGF könnte somit eine dirigierende Rolle beim Einwachsen der ersten Axone während der Ontogenese haben, die Innervationsdichte durch Kontrolle der Überlebensrate und der terminalen Verzweigungsdichte regeln, und die Funktionsfähigkeit der erwachsenen Neuronen durch Regulation der Transmittersynthese garantieren.

Für die Verifikation dieser attraktiven Hypothese ist die direkte Bestimmung des NGF-Gehalts **in vivo** von entscheidender Bedeutung. Das war bisher nicht möglich wegen der mangelnden Empfindlichkeit der zuverlässigen Meßmethoden wie Nachweis der biologischen Aktivität und zweiseitiger Radioimmuntest (Harper et al. 1980b, Suda et al. 1978). Die

zahlreichen Berichte über den Nachweis von hohen NGF-Konzentrationen im Serum und verschiedenen Organen (Johnson et al. 1971, Fabricant et al. 1977, Furukawa et al. 1979, Schwartz und Breakefield 1980, Furukawa und Hayashi 1980, Walker et al. 1980, Walker et al. 1981 und Bray et al. 1982) basieren auf kompetitiven Radioimmuntests oder Radiorezeptortests, die für NGF irreführende Ergebnisse liefern : Dabei konkurrieren NGF-bindende Stoffe in der Probe - einer davon wurde im Serum identifiziert (Ronne et al. 1979) - mit dem antiNGF-Antikörper oder NGF-Rezeptor um den radioaktiv markierten NGF, so daß fälschlich hohe endogene NGF-Konzentrationen gemessen wurden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine hinreichend empfindliche, spezifische und quantitative Nachweismethode für NGF zu entwickeln und damit Vorkommen, Synthese und Transport von endogenem NGF zu untersuchen.

3. METHODEN

3.1. Materialien und Lösungen

Materialien

Aprotinin, Benzamidinhydrochlorid, BSA, ß-Bungarotoxin, Colchicin, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), Glaskugeln (Type X), Gelatine (Kalbshaut, 60 Bloom), Glutaraldehyd (Grade I), Insulin (Rind), Laktoperoxidase, Leupeptin, m-Maleimidobenzoyl-n-hydroxysuccinimid-ester, MU, MUG, 1-O-n-Octyl-ß-D-glukosid, o-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid, 6-OH-Dopaminhydrobromid, Protein A-Agarose, Protein A-Sepharose CL-4B, Triethoxy(3-aminopropyl)silan und Triton X 100 wurden von Sigma bezogen; Benzethoniumchlorid, Coomassie Brilliant Blue R-250, Cytochrom c (Pferdeherz), 5,5-Diethylbarbitursäure, Penicillin G und Tween 20 stammten von Serva, Heidelberg; Agarose (m_r=-0.13), Biogel P 30, DEAE-Agarose (DEAE-Biogel A), 2-Merkaptoäthanol und Natriumdodecylsulfat waren von Bio-Rad. Ascorbinsäure (z.A.), BrCN, Bromphenolblau, Dimethylsulfoxid, EDTA, $Na_2S_2O_4$, Phenylmethansulfonylfluorid, Pikrinsäure (z.A.), Papain-CM-Cellulose, Streptomycinsulfat, Tetrahydrofuran (z.A.) und Toluol (z.A.) wurden von Merck bezogen. DEAE-Zellulose (DE 52) stammte von Whatman; Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium und Freund'sches Adjuvans von GIBCO; ß-Galaktosidase (E.coli) von Boehringer Mannheim, Pansorbin von Calbiochem und $Na^{125}I$ von Amersham.Schafserum wurde von Nordic bezogen; Sepharose Cl-4B und Sephadex G 25 waren von Pharmacia, Thrombin von Hoffmann-La Roche und Schaf-$F(ab')_2$-antiMaus-IgG-ß-Galaktosidase wurde von Bethesda Research Laboratories bezogen.

Glas/Glas-Homogenisatoren waren von Duall; Mikrotiterplatten (U-Form, 96 wells) und Polystyrolröhrchen wurden von

Greiner bezogen; der Silikongummi war von LKB, Wundseide (3/0) und Wundklammern (7.5 · 1.75 mm) wurden von einem medizinischen Kaufhaus bezogen, die Ultrazentrifugenröhrchen (Ultra Clear) stammten von Beckman.

Wistarratten (Neuherberg) und Swiss Albino-Mäuse wurden im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried gezüchtet. Kaninchen (New Zealand White) wurden von Ivanovas (Kisslegg) bezogen.

Lösungen

H-Puffer	100	mM	Tris/HCl, pH 7.0
	0.4	M	NaCl
	2	%	BSA
	2	%	Gelatine
	0.1	%	NaN_3
PBS	6.5	mM	Na_2HPO_4
	1.5	mM	KH_2PO_4
	137	mM	NaCl
	2.7	mM	KCl
R-Puffer	0.5	M	Tris/HCl, pH 8.5
	0.1	%	BSA
	0.5	%	Triton X 100 (v/v)
	0.02	%	NaN_3
T-Puffer	50	mM	Tris/HCl, pH 7.0
	0.2	M	NaCl
	10	mM	$CaCl_2$
	1	%	BSA
	1	%	Gelatine
	0.1	%	Triton X 100 (v/v)
	0.05	%	NaN_3

W-Puffer T-Puffer ohne BSA

Proteaseinhibitormischung (10 fach) :

40 mM	EDTA
20 mM	Benzamidinhydrochlorid
2 mM	Benzethoniumchlorid
400 Kallikrein U/ml	Aprotinin
2 mM	Phenylmethansulfonylfluorid in Dimethylsulfoxid

3.2. Reinigung polyklonaler Antikörper

Der verwendete NGF wurde nach der Methode von Bocchini und Angeletti (1969), modifiziert durch Suda et al. (1978) aus Mausspeicheldrüse isoliert. Dabei wird eine Mischung von intaktem ßNGF und ßNGF ohne das N-terminale Oktapeptid erhalten, teilweise fehlt auch das C-terminale Arginin (2.5S NGF). Die biologische Aktivität von 2.5S NGF und ßNGF ist identisch (vgl. Thoenen und Barde 1980). Schafserum gegen 2.5S NGF wurde erzeugt, wie von Suda et al. (1978) beschrieben. Polyklonale Antikörper gegen 2.5S Maus-NGF wurden aus Antiserum durch Affinitätschromatographie nach Stöckel et al. (1976) isoliert. 2.5S Maus-NGF wurde an BrCN-aktivierte Sepharose Cl-4B gebunden. Die NGF-Sepharose Säule wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8.6, 0.9% NaCl, 0.1% NaN_3, 0.5% BSA äquilibriert, mit dem Antiserum beladen und der gebundene Antikörper nach Waschen mit 30 Säulenvolumina 50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 1 M NaCl durch 4.5 M $MgCl_2$ in 50 mM Azetatpuffer, pH 5.0 eluiert. Das Eluat wurde gegen 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7.4 dialysiert und lyophilisiert. In der Immunodiffusion nach Ouchterlony wurden mit NGF und Schafantiserum 2 Präzipitationslinien beobachtet. Nach Affinitätsreinigung war nur noch 1 Bande zu sehen (Harper,

persönliche Mitteilung).

Unspezifische Antikörper wurden aus Nichtimmunserum von Schaf und Kaninchen durch Fällung bei 4°C mit 40%igem $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.7 und darauffolgende Chromatographie der Niederschlagsfraktion über eine DEAE-Zellulose-Säule (DE 52) isoliert (vgl. Fahey 1967). Die Niederschlagsfraktion wurde 2 Tage gegen 10 mM KP_i, pH 7.8 (Äquilibrierpuffer) dialysiert, auf die Säule aufgetragen, und die IgG-Fraktion mit Äquilibrierpuffer + 50 mM NaCl eluiert.

Mausserum wurde durch Herzpunktur unter Äthernarkose aus weiblichen Mäusen gewonnen, um Kontamination durch den NGF der Speicheldrüsen zu vermeiden. Unspezifische Maus-Immunglobuline wurden aus Serum durch Affinitätschromatographie an Protein A-Agarose gereinigt (s.3.3.).

3.3. Produktion und Reinigung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper wurden nach der Prozedur von Köhler und Milstein (1975) hergestellt. Balb/c Mäuse wurden mit 2.5S Maus-NGF nach der Methode von Stähli et al. (1980) immunisiert. Die aus der Milz isolierten Lymphozyten wurden mit der Maus Myeloma Zellinie Ag8.653 (Kearney et al. 1979) mittels Polyäthylenglykol fusioniert. Positive Klone wurden durch Radioimmuntest mit Protein A-Sepharose und ^{125}I-Antigen selektiert (s. 3.10.). Der antiNGF-Antikörper des Klons 27/21 wurde in allen Experimenten mit monoklonalen Antikörpern verwendet.

Die Antikörper wurden dann aus Überständen von kultivierten Hybridomazellen durch Affinitätschromatographie an einer Protein A-Agarose Säule gereinigt (vgl. Ey et al. 1978). 500 ml konditioniertes Medium wurde auf pH 8-9 gebracht, indem es offen stehen gelassen wurde (Karbonatpuffer), und dann mit 1 g Protein A-Agarose über Nacht bei 4°C rotiert. Die Protein A-Agarose wurde in eine Econo-säule von Bio-Rad gepackt, mit 10 Säulenvolumina 0.1 M NaP_i-Puffer, pH 8.5

gewaschen und der Antikörper mit 0.1 M Essigsäure, 0.15 M NaCl, pH 3.3 eluiert. Nach Dialyse gegen neutralen Phosphatpuffer wurde lyophilisiert.

Aus 500 ml Kulturüberstand konnten 2-4 mg Antikörper isoliert werden, so daß die Kapazität der Protein A-agarose mit 93 mg IgG / g Säulenmaterial ausreichend war.

Der NGF-spezifische Antikörper des Klons 27/21 wurde in allen Experimenten verwendet. Als nicht NGF-spezifische Antikörper wurden zwei monoklonale Antikörper benutzt, die gegen kontaminierende Proteine in der Standardpräparation von Rinder-NGF nach Harper et al. (1982) gerichtet sind.

3.4. Proteinbestimmung

Proteinmessungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt, mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard.

3.5. Messung der Galaktosidaseaktivität

Zur Bestimmung der Ausbeute bei Kopplungen wurde o-Nitrophenyl-ß-D-galaktosid als Substrat eingesetzt.

Im Enzymimmuntest wurde 4-Methylumbelliferyl-ß-D-galaktosid (MUG) verwendet. Die Aktivität der Galaktosidase mit MUG betrug 35% der mit o-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid gemessenen Aktivität. Die Galaktosidase wurde mit 100 µM MUG in 0.1 M NaP_i, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.3 bei 37°C für 5-30 h im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des 13-fachen Volumens 0.15 M Glyzin/NaOH, pH 10.3 gestoppt und die Fluoreszenz des entstandenen 4-Methylumbelliferon bei 364 nm Anregung und 448 nm Emission gemessen. Es wurde ein Perkin-Elmer Fluorometer (Typ 650-40, Gittermonochromatoren für Anregung und Analyse) verwendet. Alle Lösungen für die Galaktosidasemessung mit MUG wurden mit doppelt quarzdestilliertem Wasser angesetzt.

Die Enzymreaktion ist bei 37° C bis 30 h linear zeitabhängig (Fig. 1) und erreicht 70%igen Substratumsatz. Der Leerwert der MUG-Lösung ist im Dunkeln bei 4° C für mehrere Wochen stabil.

Obwohl MUG selber fluoresziert, ist die Abtrennung von nicht umgesetztem MUG unnötig, da sowohl Anregungs- als auch Emissionswellenlänge beim Reaktionsprodukt 4-Methylumbelliferon (MU) verglichen mit MUG eine ausgeprägte Rotverschiebung zeigen. Die Fluoreszenz von MU ist maximal bei pH 10.3, 364 nm Anregung und 448 nm Emission (molarer Adsorptionskoeffizient = 16720) und ist im Dunkeln für mehrere Stunden stabil (Mead et al. 1955, Leaback und Walker 1961). Die Nachweisgrenze für MU betrug 0.1 ng/ml.

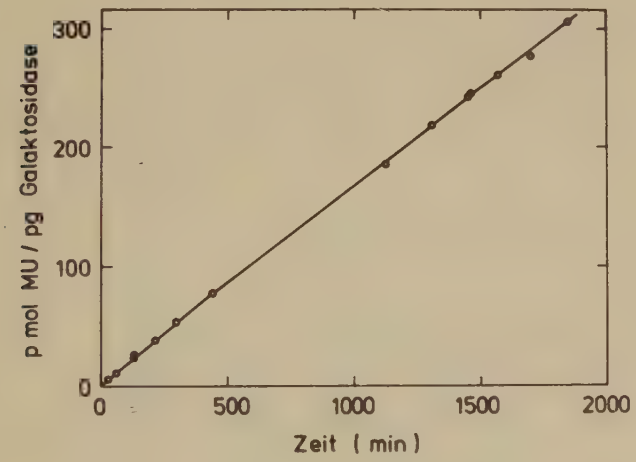


Fig. 1 Linearitätstest für ß-Galaktosidase

110 pg/ml ß-Galaktosidase in 100 µM MUG-Lösung wurden bei 37°C im Dunkeln zwischen 30 min und 30 h inkubiert und das Reaktionsprodukt MU gemessen (s.**3.5.**).

3.6. Jodierung

Die Jodierung von NGF und Antikörpern wurde mit Laktoperoxidase nach der Methode von Marchalonis (1969), modifiziert von Rohrer (1982), durchgeführt.

Ansatz:	30	µg	Protein in 0.1M NaP_i, pH 7.3
	1	µg	Laktoperoxidase in 0.1M NaP_i, pH 7.3
	5	mCi	$Na^{125}I$ in wässriger NaOH, pH 7-11
	9	nmol	H_2O_2 in 0.1M NaP_i, pH 7.3

Der Reaktionsansatz (Volumen 90 µl) wurde 2 h bei 0°C inkubiert, wobei nach der ersten halben Stunde weitere 9 nmol H_2O_2 zupipettiert wurden. Das jodierte Protein wurde vom freien Jodid und Jod durch Gelfiltration über eine Biogel P 30 Säule abgetrennt. Der Laufpuffer war 0.1 M NaP_i, pH 7.3. Sowohl NGF als auch Immunglobulin erscheinen im Ausschlußvolumen.

80-95% des eingesetzten Jod wurden in Protein eingebaut, die spezifische Aktivität betrug 50-150 Ci/g Protein. Die jodierten Proteine wurden bei 4°C gelagert und maximal 3 Wochen lang verwendet.

3.7. Doppelseitige Immunodiffusion

Die Immunodiffusion wurde nach der Methode von Ouchterlony durchgeführt (Ouchterlony und Nilsson 1973).

Die Diffusion erfolgte in einem 1%igen Agarosegel in 10 mM NaP_i, 10 mM KP_i, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.02% NaN_3, 0.5% Triton X 100. Das Antigen wurde in jeweils um den Faktor 2 abnehmenden Konzentrationen in konzentrisch angeordneten Löchern im Gel eingefüllt, der zu testende Antikörper wurde im zentralen Loch aufgetragen. Nach einem Tag wurde das Gel mehrmals mit 0.9% NaCl gewaschen (Gesamtdauer 2 Tage), mit 0.25% Coomassie Brilliant Blue in 0.9% NaCL gefärbt und in 0.9% NaCl entfärbt.

3.8. Affinitätsbestimmung der Antikörper

Kovalent an Glas gebundene oder an Polystyrol adsorbierte Antikörper wurden mit ^{125}I-NGF (2 pM - 8 nM, in T-Puffer) für 20-25 h bei Raumtemperatur oder 4 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 3x Waschen mit W-Puffer beendet und die an der festen Phase gebundene Radioaktivität gemessen. Falls erforderlich, wurde der gebundene ^{125}I-NGF durch einstündige Inkubation mit 1% Natriumdodecylsulfat, 1 N NaOH bei 37°C solubilisiert. Die unspezifische Bindung erfüllt hier nicht die üblichen Annahmen großer Kapazität und niedriger Affinität (s. Fig. 2).

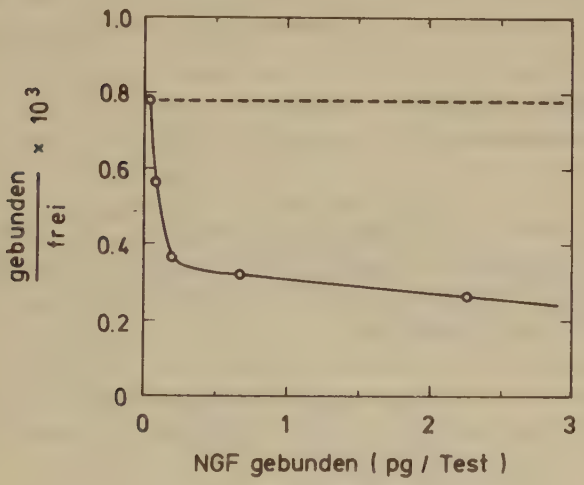


Fig. 2 Bindung von ^{125}I-NGF an unspezifische Immunglobuline

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 1 µg/ml Schaf-IgG aus Nichtimmunserum beschichtet. Nach 2mal Waschen wurde mit 20 pM - 7 nM NGF in T-Puffer 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Scatchard (1949) aufgetragen.

--- theoretische Kurve für unspezifische Bindung mit niedriger Affinität und hoher Kapazität

Daher würde die übliche Bestimmung der unspezifischen Bindung durch Überschuß von unmarkiertem Liganden zu einer Unterschätzung führen, weil dann auch die unspezifisch gebundene Radioaktivität durch nichtmarkierte NGF-Moleküle verdrängt werden kann. Die unspezifische Bindung wurde stattdessen durch Inkubation von ^{125}I-NGF mit Antikörpern ermittelt, die nicht gegen NGF gerichtet waren. Dabei wurden die gleichen Antikörper benutzt, die auch im EIT verwendet wurden.

Die unspezifische Bindung betrug maximal 5% der totalen Bindung und wurde von der mit antiNGF-Antikörper ermittelten Gesamtbindung abgezogen.

Die Affinität der jeweiligen Antikörperpopulation wurde durch Analyse der Bindungsdaten nach Scatchard (1949) bestimmt. Zumindest im Fall der polyklonalen Antikörper kann die erhaltene Affinität nur ein Durchschnittswert sein.

3.9. Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten

Assoziation

Die immobilisierten Antikörper wurden mit 2 nM ^{125}I-NGF in T-Puffer bei Raumtemperatur oder bei 37°C für verschiedene Zeiten inkubiert. Stopp der Reaktion und Radioaktivitätsmessung wie in **3.8.** beschrieben.

Die unspezifische Bindung betrug bei dieser NGF-Konzentration 1% der Gesamtbindung und wurde daher bei der Auswertung vernachlässigt. Für die Berechnung wurde eine bimolekulare Reaktion angenommen :

$$A + N \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} AN$$

Die Integration der resultierenden Differentialgleichung liefert mit der Näherung $N_t = N_o$

$$k_{+1} \cdot t = \frac{1}{K_D + N_o} \ln \left(\frac{AN_{GG}}{AN_{GG} - AN_t} \right)$$

A	Antikörperkonzentration
N	NGF-Konzentration
AN	Konzentration des Antikörper-NGF-Komplexes
Index o	Anfangskonzentration
Index t	Konzentration zur Zeit t
Index GG	Konzentration im Gleichgewicht
K_D	Dissoziationskonstante (nach **3.8.** bestimmt)

Daraus kann k_{+1} als Steigung der resultierenden Geraden bestimmt werden.

Dissoziation

Das Bindungsgleichgewicht wurde durch Präinkubation der immobilisierten Antikörper mit 1 nM ^{125}I-NGF in T-Puffer bei 37°C eingestellt. Nach 3x Waschen mit W-Puffer wurde bei 37°C in T-Puffer mit 380 nM unmarkiertem NGF inkubiert und der Anteil gebundener Radioaktivität nach verschiedenen Zeiten bestimmt, wie in **3.8.** beschrieben.

Die unspezifische Bindung betrug 1% der Gesamtbindung und wurde daher vernachlässigt. Unter der Annahme eines monomolekularen Zerfalls

$$AN \xrightarrow{k_{-1}} A + N$$

ergibt sich

$$k_{-1} \cdot t = \ln \frac{AN_o}{AN_t}$$

woraus k_{-1} bestimmt werden kann.

3.10. Protein A-Radioimmuntest

Zur Abschätzung der Antigenbindungsaktivität einer Antikörperlösung wurde eine Modifikation des Protein A-Radioimmuntests von Jonsson und Kronvall (1974) verwendet.

Ansatz: 200 µl Antikörperlösung, pH 8.5
40 µl ^{125}I-NGF in R-Puffer (50000 cpm)
30 µl Pansorbin (10%ige Suspension (w/v) fixierter Staphylococcus aureus Zellen), 1:1 verdünnt mit R-puffer

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, mit 1 ml R-Puffer verdünnt und abzentrifugiert (1 min, Eppendorf Tischzentrifuge). Der Niederschlag wurde in 1 ml R-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und die gebundene Radioaktivität gemessen.

Im Sättigungsbereich wurden 40-70% des zugesetzten ^{125}I-NGF präzipitiert. Der Leerwert betrug 1%. Im Bereich 0.01-0.4 µg Antikörper/ml waren halbquantitative Bestimmungen der eingesetzten Antikörpermenge durch Vergleich mit einer Standardkurve möglich.

3.11. Agarosegel-Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde modifiziert nach Miyake et al. (1977) in einem horizontalen, 1%igen Agarosegel (m_r=-0.13) unter Eiskühlung durchgeführt. Der Laufpuffer (92 mM Tris, 30 mM Diethylbarbitursäure, 0.1% Triton X 100 (v/v), pH 8.6) wurde zwischen Kathode und Anode umgepumpt. Die Feldstärke betrug 20 V/cm und die Dauer 2 h.

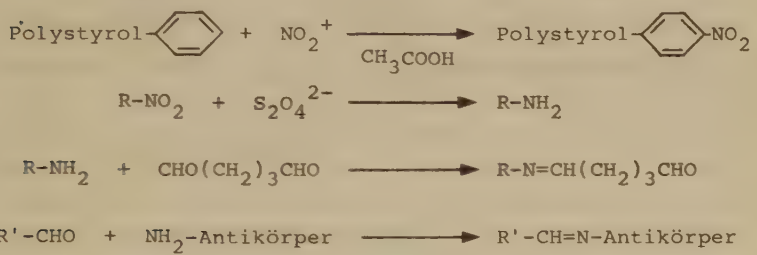
Die Gele wurden zum Fixieren der Proteine 15 min bei Raumtemperatur in 50 mM Pikrinsäure, 17% Essigsäure (v/v) inkubiert, 10 min mit 100% EtOH gewaschen und bei 30°C auf

Folie (LKB) aufgetrocknet. Nach 15 min Färben mit 0.25% Coomassie Brilliant Blue in einem MeOH, H_2O, Essigsäure-Gemisch (5:5:1) wurde 3·15 min in der 5:5:1-Mischung entfärbt.

3.12. Kovalente Bindung von Antikörpern an Polystyrol

Die Methode von Neurath und Strick (1981) wurde modifiziert zur Kopplung von Antikörpern an Polystyrol verwendet.

Reaktionsprinzip :

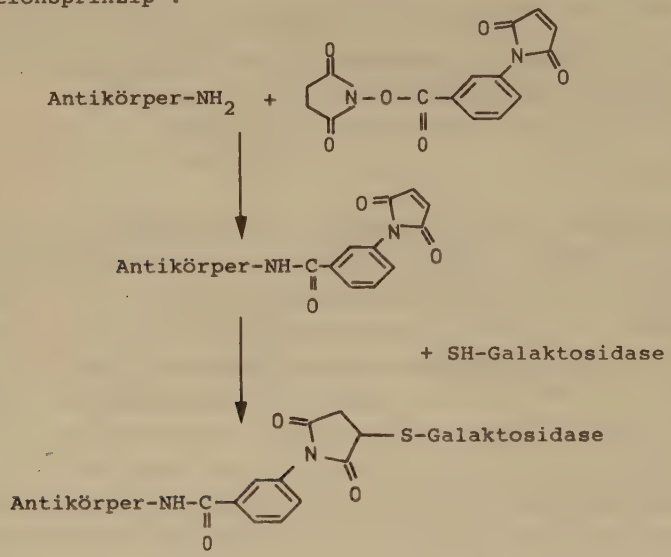


Eine Mikrotiterplatte wurde mit einem 1:1 Gemisch von rauchender HNO_3 und Eisessig gefüllt und 2 h bei 35 °C inkubiert. Mit H_2O_{dest} wurde neutral gewaschen. Durch 2 h Inkubation mit 0.5% $Na_2S_2O_4$ in 0.5 M NaOH bei 50°C wurden die eingeführten Nitrogruppen zu Aminogruppen reduziert. Nach Waschen mit H_2O_{dest} wurden die Platten mit 1%igem Glutaraldehyd in 50 mM NaP_i-Puffer, pH 8.5 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Waschen mit Antikörper-Lösung (5 µg/ml 50 mM NaP_i, pH 8.5) inkubiert. Die Kopplungsreaktion wurde durch Waschen mit neutralem Phosphatpuffer beendet, und die noch vorhandenen freien Aldehydgruppen durch Reaktion mit 1 M Glyzin/NaOH, pH 8.5 abgesättigt.

3.13. Kopplung von ß-Galaktosidase an Antikörper

Die Kopplung wurde mit dem heterobifunktionalen Reagenz m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid-ester nach der Methode von O'Sullivan et al. (1979b) durchgeführt.

Reaktionsprinzip :



1. Reaktionsschritt :

Ansatz: 1 mg Antikörper in 1 ml 0.1 M NaP_i,pH 7.0,50 mM NaCl
0.25 mg m-Maleimidobenzoyl-n-hydroxysuccinimid-ester in 10 µl Tetrahydrofuran

Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30°C geschüttelt. Der Überschuß an freiem m-Maleimidobenzoyl-n-hydroxysuccinimid-ester wurde auf einer 30 cm langen Sephadex G25 Säule abgetrennt. Äquilibrierpuffer und Laufpuffer war 10 mM NaP_i, pH 7.0, 50 mM NaCl, die Fließgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/min. Das Protein lief im Ausschlußvolumen. Die Ausbeute war 30-50%.

2.Reaktionsschritt :

Ansatz: 2-4 ml Peakfraktion der Sephadex G25 Säule
1 mg ß-Galaktosidase in Laufpuffer+10 mM $MgCl_2$

Der Ansatz wurde 1 h bei 30°C geschüttelt und durch Zugabe von 2-Merkaptoäthanol (1 M in Laufpuffer) gestoppt. Die Endkonzentration von 2-Merkaptoäthanol war 10 mM. Das Konjugat wurde mit BSA und NaN_3 versetzt (Endkonzentrationen 0.1% und 0.05%) und bei 4°C gelagert.

3.14. Ligatur des Ischiasnervs

Männliche Wistarratten,150 g schwer,wurden mit Diäthyläther betäubt. Ein dorsaler Längsschnitt im linken Oberschenkel durch Haut und Muskelschicht legte den Ischiasnerv frei. Der Nerv wurde von anhängendem Fettgewebe getrennt und 1 cm proximal zur Verzweigung in peronealen und tibialen Nerv mit einer Uhrmacherpinzette (Dumont, Größe 5) zerquetscht. Die Endoneuralscheide wird dabei nicht durchtrennt, und deswegen zusätzlich mit 0.14 mm starkem Nylonfaden (gewöhnlicher Nähfaden) abgebunden. Die Haut wurde mit Wundklammern geschlossen.

Alle behandelten Ratten überlebten. Die Wirkung des Eingriffs zeigte sich darin, daß die Tiere das operierte Bein nicht mehr benutzen konnten.

3.15. Sialektomie

Männliche Swiss Albino Mäuse, 2-3 Monate alt, wurden mit Diäthyläther betäubt. Ein ventraler Längsschnitt durch die Halshaut vom Brustansatz bis zur Schnauze legte die submandibulare Speicheldrüse frei. Sie wurde mit einer stumpfen Pinzette von dem umgebenden Fettgewebe gelöst. Die zugehörigen Venen wurden zusammen mit den Speichelausfüh-

rungskanälen mit Wundseide abgebunden und die Speicheldrüse kurz hinter der Einschnürung abgeschnitten. Die Haut wurde mit Wundklammern geschlossen. Die Mortalität betrug 15%.

3.16. Zerstörung sympathischer Nervenendigungen mit 6-OH-Dopamin

6-OH-Dopamin gelangt als "falscher Transmitter" über das hochaffine Noradrenalin-Aufnahmesystem in die Nervenendigungen sympathischer Neuronen (vgl. Thoenen 1972). Die darauffolgende Zerstörung der Nervenendigungen wird bei erwachsenen Tieren nach einiger Zeit durch Regeneration ausgeglichen. Der retrograde axonale Transport von NGF wird also spezifisch im sympathischen Nervensystem unterbunden,da die Aufnahme in die Nervenendigungen verhindert wird.

Wistarratten beiden Geschlechts, 150-200 g schwer, wurde unter Äthernarkose intraperitoneal 100 mg 6-OH-Dopamin/kg Körpergewicht injiziert. Das verwendete 6-OH-Dopaminhydrobromid wurde jeweils frisch in PBS, 1.5 mg/ml Ascorbinsäure gelöst und 1 ml pro Ratte verwendet. Die Ascorbinsäure wird wegen ihrer reduzierenden Wirkung zugesetzt, da 6-OH-Dopamin sehr oxidationsempfindlich ist. Die Kontrolltiere wurden nur mit PBS/Ascorbinsäure gespritzt. Die Mortalität bei den Kontrollen betrug 0%, während 5% der mit 6-OH-Dopamin behandelten Tiere starben. 3-50 h nach einer einmaligen Injektion wurden die Ratten dekapitiert und die entnommenen Organe in Trockeneis eingefroren.

Es wurden nur die Ratten verwendet, bei denen eine starke sympathomimetische Reaktion auftrat. Dieser Effekt wird durch die Freisetzung großer Transmittermengen aus den zerstörten Nervenendigungen bewirkt und ist durch gesträubtes Fell und erhöhten Augendruck erkennbar. Die Wirkung setzte bereits nach 3-5 min ein und hielt 1-2 h an. Das Fehlen der sympathischen Übertragung ist zwischen 6 h und 1.5 Tagen anhand der fast geschlossenen Augenlider

feststellbar, während nach 2 Tagen das Aussehen der Ratten sich weitgehend normalisiert hat. Das kann auf beginnende Regeneration, Überempfindlichkeit der denervierten Endorgane oder Kompensation durch erhöhte Transmitterproduktion in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks zurückzuführen sein (vgl. Thoenen 1972).

Die verwendete Dosis von 100 mg/kg liegt im Sättigungsbereich für die Zerstörung der sympathischen Nervenendigungen (vgl. Thoenen 1972).

3.17. Blockade des axonalen Transports mit Colchicin

Colchicin verhindert die Polymerisation von Tubulin zu den Microtubuli, die einen zentralen Bestandteil des Zytoskeletts bilden. Der schnelle axonale Transport hängt in beiden Richtungen vom Vorhandensein intakter Mikrotubuli ab, ist also durch Colchicin blockierbar (vgl. Schwab und Thoenen 1983).

Weiblichen Wistarratten, 150 g schwer, wurde unter Äthernarkose intraperitoneal eine einmalige Dosis im Bereich 1-10 mg Colchicin / kg Körpergewicht gegeben. Das Colchicin wurde in PBS gelöst und 1 ml pro Ratte injiziert; Kontrolltiere erhielten nur PBS. Nach 12 h wurden die Ratten dekapitiert und die entnommenen Organe in Trockeneis eingefroren.

Mit der niedrigeren Dosis war keine äußerliche Veränderung an den Ratten feststellbar, während bei der höheren Dosis Durchfall, verringerter Bewegungsdrang und gesträubtes Fell beobachtet wurden. Diese Wirkungen traten erst 2 h nach dem Eingriff auf. Bei der höchsten Dosis betrug die Mortalität nach 12 h 50%, während alle Kontrolltiere überlebten.

3.18. Messung der biologischen Aktivität von NGF

Die biologische Aktivität von NGF wurde nach Fenton (1970) untersucht. Je drei Spinalganglien aus 8-10 Tage alten Hühnerembryonen wurden in 80 µl Kulturmedium bei 3.5% CO_2, 100% Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert und das Neuritenwachstum nach einem Tag in Kultur beobachtet (subjektive Einheiten, Bereich 0-4). 10-15 SCG aus adulten Wistarratten wurden in 150 µl Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2% BSA, 2% Gelatine, Aprotinin (35 Kallikrein U/ml), Leupeptin (10^{-4} M), 200 U/ml Penicillin und 200 U/ml Streptomycin bei 0°C homogenisiert (Glas/Glas). Das Homogenat wurde 2 min bei Raumtemperatur bei 10^5 g zentrifugiert (Ultra Clear Zentrifugenröhrchen, Beckman Airfuge). Der Überstand erhält durch Zugabe von 22 µg Thrombin und 18 µl Hühnerplasma auf 55 µl eine gelartige Konsistenz. Für die Überprüfung der Spezifität des biologischen Effekts wurden 10 µg/ml Schaf-antiNGF-Antikörper dem Überstand der Zentrifugation zugesetzt.

Für jeden Versuch wurde eine Standardkurve im Bereich 0.5-20 ng/ml NGF im selben Medium gemessen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Entwicklung des Enzymimmuntests für NGF

Der verwendete zweiseitige Enzymimmuntest vermeidet die systematischen Fehler, die beim kompetitiven Immuntest auftreten (s. 5.1.).

NGF wird an einen großen Überschuß Festphasen-Antikörper gebunden. Der immobilisierte NGF wird dann durch einen zweiten, markierten Antikörper quantifiziert. Der zweite Antikörper ist an ß-Galaktosidase gekoppelt, die durch das fluoreszierende Reaktionsprodukt 4-Methylumbelliferon bestimmt wird. Der Ablauf ist schematisch in Fig. 3 dargestellt.

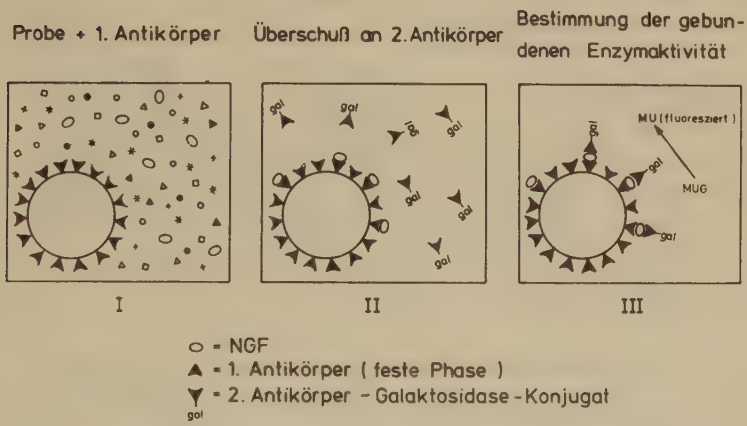


Fig. 3 Schema des zweiseitigen Enzymimmuntests (EIT)

4.1.1. Produktion und Reinigung der Antikörper

Der nach üblichen Reinigungsvorschriften isolierte NGF enthält sehr immunogene Kontaminanten (Tomita und Varon 1971, Carstairs et al. 1977). Bei der Reinigung polyklonaler Antikörper werden die Antikörper gegen diese Kontaminanten durch die Affinitätschromatographie zwar reduziert, aber nicht vollständig beseitigt, da die kontaminierenden Antigene ja auch in der Affinitätssäule enthalten sind. Obwohl die verwendeten affinitätsgereinigten Schaf-antiNGF-Antikörper nach den Kriterien der Immunodiffusion monospezifisch waren (vgl. **3.2.**), kann daher die Gegenwart kleiner Mengen kontaminierender Antikörper nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde versucht, durch Immunisation mit sehr niedrigen NGF-Dosen die Erzeugung von Antikörpern gegen kontaminierende Bestandteile zu verringern und gleichzeitig für hochaffine Antikörper zu selektieren. Wenn die Antigenkonzentration sehr niedrig ist, sollten nur die B Lymphozyten mit hochaffinen Antikörpern aktiviert werden (vgl. Eisen und Siskind 1964).

Immunisationsschema :

5 bzw. 10 µg NGF in 1 ml komplettem Freund'schen Adjuvans, 1:1 verdünnt mit Phosphatpuffer, wurden subkutan in 2 weibliche Kaninchen injiziert. Die Emulsion wurde auf 20-30 Stellen im Rückenbereich verteilt. Alle 2 Wochen wurde dieselbe NGF-Dosis, in inkomplettem Freund'schen Adjuvans, injiziert.

Die Affinität der produzierten Antikörper wurde nach **3.8.** gemessen, die Menge durch Affinitätsreinigung nach **3.2.** bestimmt. Die Kaninchen produzierten schon 1 Woche nach dem ersten Boost Antikörper gegen NGF. Die Konzentration stieg von 0.1 mg Antikörper/ml Serum (kein Unterschied bei 5 µg und 10 µg Dosis) auf maximal 0.3 mg/ml nach 6 Monaten. Bei Verwendung von NGF als Antigen wurden maximal 5 mg

Antikörper/ml Serum erreicht (Immunisation mit 1 mg NGF pro Schaf, Stöckel et al. 1976). Die Affinität der Antikörper war mit 0.28 ± 0.05 nM für die Dissoziationskonstante nicht wesentlich von der mittleren Affinität der polyklonalen Schafantikörper verschieden (vgl **4.1.2.**).

Das Antiserum beider Kaninchen zeigte 2 Banden gegen NGF in der doppelseitigen Immunodiffusion nach Ouchterlony. Nach Affinitätschromatographie war nur noch die NGF-Präzipitationslinie sichtbar (Fig. 4).

Damit war die Immunisation mit sehr kleinen Antigenmengen zwar erfolgreich, brachte aber gegenüber den polyklonalen Schafantikörpern keine Verbesserung bezüglich Reinheit oder Affinität der Antikörper. Aus Mengengründen wurden daher im folgenden immer die NGF-spezifischen Schafantikörper eingesetzt.

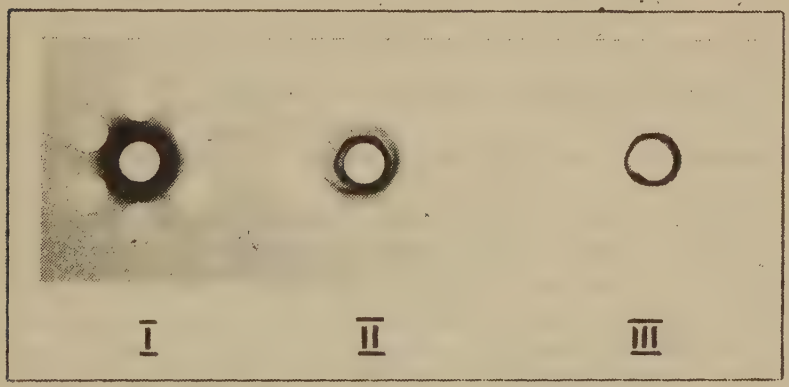


Fig. 4 Immunodiffusion von Kaninchen-antiNGF-Antikörper gegen NGF

Die äußeren Löcher enthalten im Uhrzeigersinn abnehmende NGF-Mengen, anfangend mit 20 µg NGF (oben). Das zentrale Loch enthält jeweils den zu testenden Antikörper.

I 100 µl Kaninchen-antiNGF-Antiserum, (10 µg NGF-Dosis) lyophilisiert und in 20 µl Puffer (s.**3.7.**) aufgenommen.

II 100 µl Kaninchen-antiNGF-Antiserum, (5 µg NGF-Dosis) lyophilisiert und in 20 µl Puffer (s.**3.7.**) aufgenommen.

III 90 µg an NGF-Sepharose affinitätsgereinigte Kaninchen-antiNGF-Antikörper (5, 10 µg NGF-Dosis) in 20 µl Puffer (s.**3.7.**).

Monoklonale Antikörper wurden aus konditioniertem Medium durch Affinitätschromatographie an Protein A gereinigt. Da die Hybridomazellen in rinderserumhaltigem Kulturmedium gezüchtet wurden und bekannt ist, daß manche Rinderimmunglobuline an Protein A binden (Goudswaard et al. 1978), wurde das komplette Kulturmedium über eine Protein A Säule nach **3.3.** gereinigt. Das Eluat enthielt 2 µg Protein/ml Kulturmedium. Übereinstimmende Ergebnisse wurden von Underwood et al. (1983) erhalten. Damit ist bei konditioniertem Medium des 27/21-Hybridoma-Klons der Anteil NGF-spezifischer Antikörper im Protein A-Eluat 30-70% des gesamten Immunglobulins. Der Prozentsatz ist nicht konstant, weil die Antikörperproduktion des Klons variabel ist.

Derselbe monoklonale Antikörper (27/21) konnte gleichzeitig als erster und zweiter Antikörper verwendet werden, da NGF aus zwei identischen Untereinheiten besteht.

4.1.2. Immobilisierung des ersten Antikörpers

Adsorption an verschiedene Oberflächen

In einem Vorversuch wurden Polystyrol (Mikrotiterplatten), Silikongummi (geachtelte Schlauchabschnitte) und Glas (Pasteurpipetten) auf ihre Eignung zur Adsorption des 1. Antikörpers untersucht. Sie wurden über Nacht mit 1 µg/ml Schaf-antiNGF-antikörper in 50 mM Tris/HCl, pH 9.0 beschichtet, 2x gewaschen und mit 2 ng/ml NGF in T-Puffer oder T-Puffer alleine 3 h bei 37°C inkubiert. Nach 2x Waschen wurde 4 h mit SaNGF-Galaktosidase-Konjugat (0.4 U_{MUG}/ml bei 37°C inkubiert und nach weiteren 3 Waschungen die gebundene Enzymaktivität nach **3.5.** bestimmt. Alle Waschungen wurden mit W-Puffer durchgeführt. Die erhaltenen Fluoreszenz-Signale wurden auf gleiche Oberfläche umgerechnet. Weder beim Hintergrundsignal noch beim Signal/Rausch-Verhältnis waren relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen

Oberflächen vorhanden (Tab. 1). Wegen der besseren Handhabbarkeit wurden deswegen die weiteren Versuche mit Mikrotiterplatten durchgeführt.

Tab. 1 Eignung verschiedener Oberflächen als feste Phase im EIT

feste Phase	$\frac{\mu U \text{ Gal gebunden}}{cm^2 \text{ antikörperbeschichtete Fläche}}$ bei 0 ng NGF/ml	2 ng NGF/ml	S/R
Polystyrol	1.2 ± 0.1	7.1 ± 0.2	5.0
Silikongummi	2.0 ± 0.3	8.7 ± 1.4	3.4
Glas	0.7 ± 0.3	3.8 ± 0.9	4.9

Adsorption an Polystyrol

Die Adsorption wurde bei pH 7.5 und 9.0 durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg/ml SaNGF in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 oder 9.0 beschichtet. Die adsorbierten Antikörper wurden durch Bindung von ^{125}I-NGF in T-Puffer gemessen. Bei pH 7.5 in der Beschichtungslösung wurde 2-3mal weniger NGF gebunden als bei pH 9.0. Daher wurde im weiteren stets bei pH 9.0 beschichtet.

Der Zeitverlauf der Adsorption wurde durch Beschichtung mit 6 µg/ml SaNGF im Bereich 30 min - 5 h untersucht. Die adsorbierten Antikörper wurden durch Bindung von 40 nM ^{125}I-NGF quantifiziert. Maximale NGF-Bindung wurde schon nach 30minütiger Adsorption erreicht.

Die Proteinkonzentration in der Beschichtungslösung wurde zwischen 0.2 und 5 µg/ml variiert und die Auswirkung auf den

EIT untersucht. Das spezifische Signal stieg zunächst mit zunehmender Antikörperkonzentration in der Beschichtungslösung und erreichte bei 1 µg/ml seinen höchsten Wert bei gleichzeitig optimalem Signal/Rausch-Verhältnis (Fig. 5).

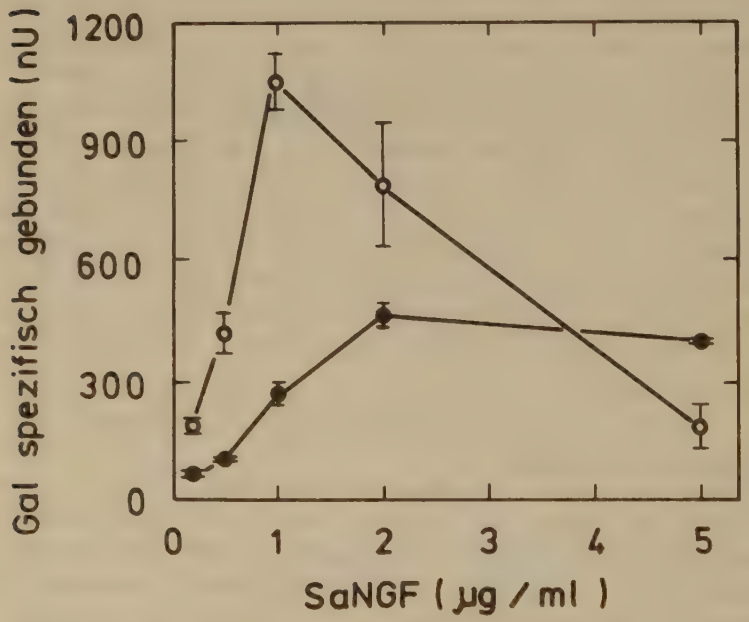


Fig. 5 Spezifisches Signal und Hintergrundsignal im EIT als Funktion der Antikörperkonzentration in der Beschichtungslösung

Die Mikrotiterplatten wurden mit 200 µl SaNGF (0.2 - 5 µg pro ml) pro Gefäß über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, 2mal mit W-Puffer gewaschen, 3 h bei 37°C mit 0 oder 0.5 ng NGF/ml T-Puffer (100 µl/Gefäß) inkubiert und wieder 2mal mit W-Puffer gewaschen. Pro Gefäß wurden 100 µl SaNGF-Galaktosidase in T-Puffer zugesetzt und 3.5 h bei 37°C und 0.3 Hz geschüttelt. Nach 3mal Waschen mit W-Puffer wurde das gebundene Enzym nach 3.5. gemessen. Die Daten sind Mittelwerte von Quadruplikaten ± SEM.

- ○ Spezifisches Signal bei 0.5 ng NGF/ml
- ● Hintergrundsignal (0 ng NGF/ml)

Nach Beschichtung mit 1 µg/ml 27/21-Antikörper wurde der Überstand zum Beschichten einer neuen Mikrotiterplatte verwandt. Die adsorbierten Antikörper wurden mit einem Schaf-F(ab')$_2$-antiMaus-IgG-ß-D-Galaktosidase-Konjugat quantifiziert. Die zweite Mikrotiterplatte enthielt keine meßbaren Mengen Antikörper mehr. Damit wurden also alle eingesetzten Antikörper adsorbiert, was einer Flächendichte von 140 ng/cm^2 entspricht. Bei einer monomolekularen Belegung einer glatten Oberfläche mit Antikörpermolekülen können 110-270 ng IgG pro cm^2 Oberfläche adsorbiert werden. Diese Zahlen wurden aus Molekulargewicht (150000) und Radius (5.2 - 8 nm) der IgG-Moleküle für eine dichteste Kugelpackung berechnet. Der Radius von 8 nm wurde aus den Röntgenstreuungsdaten für kristalline Moleküle entnommen (Cathou 1978); 5.2 nm sind der hydrodynamische Radius, der sich aus dem partiellen spezifischen Volumen (0.738 cm^3/g), dem Molekulargewicht und dem Korrekturfaktor (1.47) für den Reibungskoeffizienten ergibt (Marler et al. 1964, Noelken et al. 1965, Edsall 1953). D.h., die für den EIT optimale Konzentration führt zu einer dichten monomolekularen Schicht von Antikörpermolekülen auf der Polystyroloberfläche.

Bei den höheren Antikörperkonzentrationen in der Beschichtungslösung (2 und 5 µg/ml) sank das spezifische Signal wieder. Bei diesen Konzentrationen findet neben Adsorption von Protein an Plastik auch Adsorption von Protein an Protein statt, die vermutlich kinetisch nicht so stabil ist, und so zum Verlust von Antikörper-NGF-Komplexen führt.

Bei optimaler Konzentration in der Beschichtungslösung werden zunächst nahezu alle eingesetzten Antikörper an Polystyrol gebunden (s.o.). Die Durchführung des EIT mit ^{125}I-Antikörper zeigte allerdings, daß bis zu 85% des anfänglich immobilisierten Antikörpers wieder weggewaschen wurden, wobei der größte Verlust schon bei der ersten Waschung auftrat (Fig. 6).

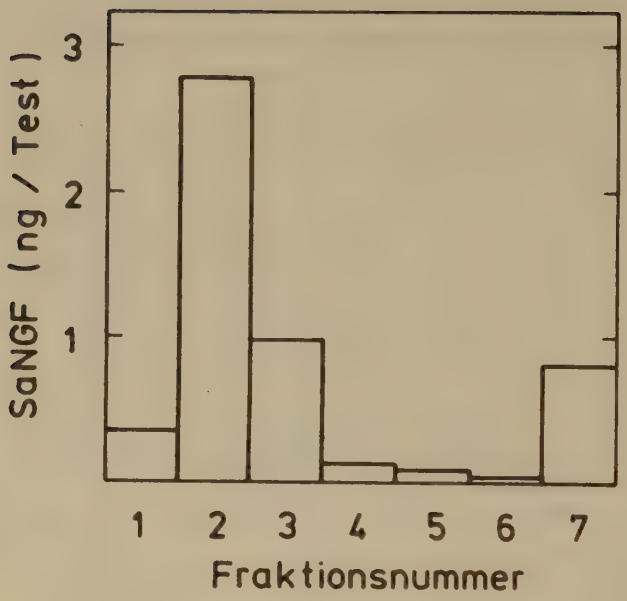


Fig. 6 Verlust des adsorbierten Antikörpers während des EIT

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 26 ng/ml ^{125}I-SaNGF beschichtet. Der EIT wurde mit den unten angegebenen Inkubationszeiten durchgeführt. Der Antikörpergehalt der folgenden Fraktionen wurde gemessen :

1 Überstand der Beschichtung (15 h, Raumtemperatur)
2 2x Waschpuffer
3 Überstand der Inkubation mit NGF (4 h, 37°C)
4 2x Waschpuffer
5 Überstand der Inkubation mit 2. Antikörper (1.5 h, 37°C)
6 2x Waschpuffer
7 feste Phase nach den Schritten 1-6

Der Grund ist wahrscheinlich das nichtionische Detergens Triton X 100, das in Wasch- und Inkubationspuffer enthalten ist und in die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Antikörper und Polystyrol eingreift.

Damit stimmt die Beobachtung überein, daß bei einer Bestimmung der Antikörperaffinität nach **3.8.** mit zunehmender Länge der ^{125}I-NGF-Inkubation die pro Gefäß immobilisierte Antikörpermenge stark absinkt.

Die Gegenwart des Detergens ist andererseits essentiell, um unspezifische Adsorption an die feste Phase auf ein Minimum zu reduzieren.

Kovalente Kopplung an Polystyrol

Der Ausweg aus diesem Dilemma ist die kovalente Kopplung des ersten Antikörpers an die feste Phase, die ein Auswaschen der Beschichtung verhindert.

Aminogruppen wurden nach der Methode von Neurath und Strick (1981) in Polystyrol eingeführt und mit einem Überschuß von Glutaraldehyd umgesetzt. Die freien Aldehydgruppen wurden zur Bindung des Antikörpers über seine Aminogruppen benutzt. Die Reaktion wurde durchgeführt wie in **3.12.** beschrieben.

Mit dieser Antikörperpräparation wurde dann der EIT, wie in Fig. 5 beschrieben, durchgeführt. Das Signal/Rausch-Verhältnis war niedriger als bei adsorbiertem Antikörper (Tab. 2). Der Grund für das erhöhte Hintergrundsignal ist vermutlich die Oberflächenvergrößerung der Reaktionsgefäße durch Anlösen des Polystyrol in der Nitriersäure (milchiges Aussehen nach Nitrierung).

Daraufhin wurde die Eignung von Glas zur kovalenten Modifizierung untersucht.

Tab. 2 Kovalent an Polystyrol gebundene und an Polystyrol adsorbierte Antikörper als feste Phase im EIT

SaNGF-Antikörper immobilisiert durch	µU Gal spezifisch gebunden bei 1 ng NGF/ml	Hintergrundsignal (µU Gal)	S/R
Adsorption	2.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	2.7
Kopplung	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.04	0.8

Angegeben wird die Galaktosidase-Aktivität pro Ansatz

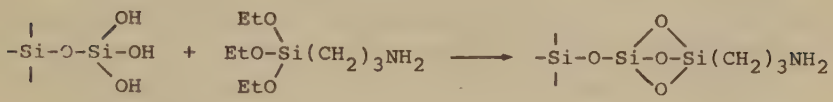
Kovalente Kopplung an Glas

Als feste Phase wurden Glaskugeln ausgewählt, da bei der gewünschten Miniaturisierung des Tests bei Hohlgefäßen die Oberfläche zwangsläufig weniger stark reduziert wird als das Volumen der Testlösung. Da aber der Leerwert im EIT proportional der eingesetzten Oberfläche ist, können sehr verdünnte Antigen-Lösungen wegen des sinkenden Signal-Rausch-Verhältnisses nicht mehr gemessen werden. Demgegenüber kann bei der Verwendung von Kugeln als reaktiver Oberfläche das Verhältnis Testvolumen/Oberfläche nach Bedarf eingestellt werden. Voraussetzung ist natürlich, daß die Kugel für die Nachweisreaktion in ein neues Gefäß kommt.

Die Kopplungsreaktion wurde in mehreren Stufen durchgeführt, so daß der Antikörper nie mit Überschuß an Kopplungsreagenz in Berührung kam. Die Methode von Weetall (1970) wurde mit Modifikationen zur Einführung von Aminogruppen ins Glas benutzt. Die Antikörper wurden dann über Glutaraldehyd als Linker ans Glas gekoppelt.

Reaktionsprinzip für die Glasaktivierung :

(weitere Reaktionen wie in **3.12.**)



Ansatz : 10 g Glaskugeln (1 mm Ø, mit $HNO_{3konz.}$ gereinigt)
2 ml Triethoxy(3-aminopropyl)silan
18 ml Toluol

Der Ansatz wurde für 0.5-5 h unter Rückfluß gekocht. Die Glaskugeln wurden 5mal mit Toluol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und mit Glutaraldehyd (0.0001-1% in 0.1 M KP_i, pH 7.4, 200 Kugeln/ml) für 1-15 h bei 4°C inkubiert. Die Kugeln wurden 6mal mit Wasser gewaschen und mit 5-100 µg Antikörper pro ml 0.1 M KP_i, pH 7.4 für 3-15 h bei 4°C inkubiert (400 Kugeln/ml). Die Reaktion wurde durch Waschen mit W-Puffer beendet. Alle wässrigen Lösungen wurden mit quarzdestilliertem Wasser angesetzt, um Kontaminationen mit Spuren von freien Aminen auszuschließen.

Die Kugeln wurden bei 4°C in W-Puffer gelagert und konnten mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust verwendet werden.

Das Verhältnis Testvolumen zu Antikörper-tragender Oberfläche wurde zwischen 50 µl/3.14 mm^2 und 50 µl/15.7 mm^2 variiert.Der erste Antikörper wurde unter Standardbedingungen (s.u.) gekoppelt und spezifisches Signal und Signal-Rausch-Verhältnis im EIT untersucht (Fig. 7). Als optimal erwiesen sich 50 µl Testvolumen pro Kugel mit 1 mm Ø.

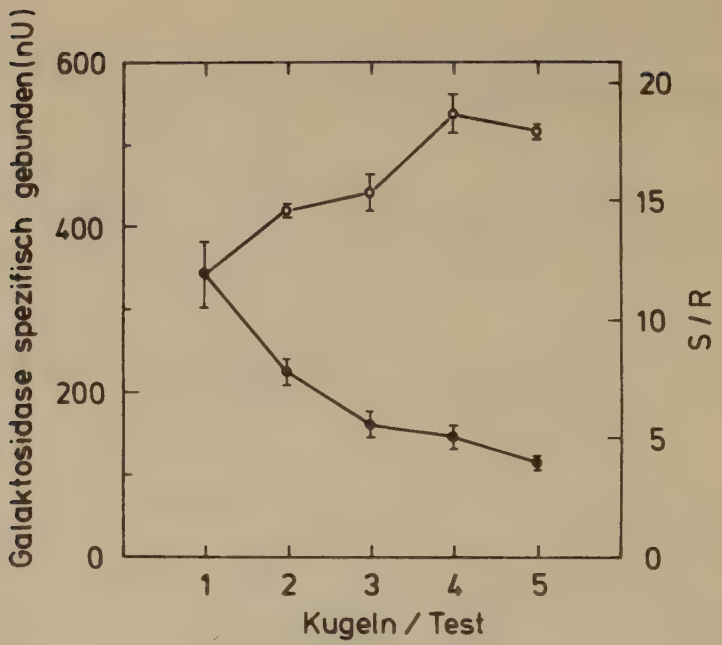


Fig. 7 Verhältnis von reaktiver Oberfläche zu Testvolumen im EIT

1 bis 5 SaNGF-Kugeln wurden pro 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Der EIT wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

- o Spezifisches Signal bei 0.5 ng NGF/ml (linke Skala)
- • Signal/Rausch-Verhältnis (rechte Skala)

Die Zeitdauer der Silylierung wurde zwischen 0.5 und 5 h variiert, was keinen Einfluß auf die Effizienz der Kopplung hatte. Die gekoppelten 27/21-Antikörper wurden durch Inkubation mit Schaf-F(ab')$_2$-antiMaus-IgG-ß-D-Galaktosidase-Konjugat quantifiziert.

Die Variation der Reaktionsdauer mit Glutaraldehyd zwischen 1 und 15 h hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Effizienz der Kopplungsreaktion .

Der Einfluß der Glutaraldehydkonzentration (0.0001 - 1%) auf Affinität und Zahl der gekoppelten Antikörper wurde durch Bindung von ^{125}I-NGF untersucht, wie in **3.8.** beschrieben. Die unspezifische Bindung wurde mit Präimmun-IgG-Kugeln bestimmt, die mit 1% Glutaraldehyd hergestellt wurden. Die allgemeinen Reaktionsbedingungen waren hier 4 h Reaktion mit Glutaraldehyd und 3 h Reaktion mit der Antikörperlösung (100 µg 27/21-Antikörper/ml).

Bei 0.001% Glutaraldehyd und weniger wurde keine spezifische NGF-Bindung gefunden (Tab. 3). Bei 0.01% Glutaraldehyd wurden noch 29% der maximalen Antikörpermenge gekoppelt. Die Affinität der Antikörper stieg mit abnehmender Glutaraldehydkonzentration auf das Doppelte des Anfangswertes (Tab. 3).

Tab. 3 Glutaraldehydkonzentration bei der Kopplung an Glas

Glutaraldehyd-konzentration (Volumen%)	Kapazität (pg NGF/Kugel)	K_D (nM)
0.0001	< 1	-
0.0010	< 1	-
0.010	17	0.13
0.032	38	0.26
0.10	44	0.25
0.32	47	0.25
1.0	58	0.32

Die Wahrscheinlichkeit für Mehrfachbindung eines Antikörpermoleküles nimmt mit steigender Glutaraldehydkonzentration zu, und möglicherweise verringert eine zu rigide Immobilisierung des Antikörpermoleküls die Antikörper-Antigen-Bindungsstärke. Bei der Kopplung mit 1% Glutaraldehyd wurde maximale NGF-Bindung erhalten, da die höhere Kapazität den Einfluß der verringerten Affinität überwiegt.

Die Variation der Inkubationsdauer mit Antikörperlösung zwischen 3 und 15 h hatte keinen Einfluß auf die Kopplungsreaktion.

Die Kopplung wurde mit 5, 50, 75 und 100 µg Protein/ml durchgeführt und die Effizienz der Kopplung nach der Anzahl und Affinität der gebundenen Antikörper (s.3.8.) beurteilt. Bei 5 µg/ml wurden wesentlich weniger Antikörper gekoppelt als bei den höheren Proteinkonzentrationen; zwischen 50 und 100 µg/ml gab es keine wesentlichen Unterschiede (Tab. 4).

Tab. 4 Antikörperkonzentration bei der Kopplung an Glaskugeln

27/21-Antikörper (µg/ml)	Kapazität (ng NGF/Kugel)	K_D (nM)
5	0.04	-
50	0.22	0.22
75	0.24	0.26
100	0.15	0.28

Da es Hinweise auf störende Wechselwirkungen mit dem Fc-Teil der Antikörpermoleküle im Immuntest gibt (Kato et al. 1979), wurde versucht, durch Kopplung von Fab-Fragmenten statt vollständigen IgG-Molekülen das Hintergrundsignal zu reduzieren. Durch Papainverdau des monoklonalen Antikörpers 27/21 nach Mage (1980) wurde der Fc-Teil der Immunglobuline abgespalten, der für die Antigenbindungsaktivität nicht benötigt wird. Da nur der Fc-Teil an Protein A bindet, konnten Fc-Fragment und unverdaute Antikörper durch Chromatographie an Protein A-Agarose (s.3.3.) abgetrennt werden. Das Papain ist an CM-Zellulose gekoppelt, erscheint also nicht im Durchlauf der Protein A-Säule. Die Effizienz des Verdaus betrug etwa 50%.

Bei identischen Kopplungsbedingungen für Fab-Fragment und ganze IgG-Moleküle war das Hintergrundsignal der Fragmente im EIT sogar größer als das der IgG-Moleküle. Möglicherweise werden die Fragmente bei Verdau teilweise denaturiert, was in erhöhter unspezifischer Bindung resultieren könnte. Aus den Daten kann jedenfalls geschlossen werden, daß das Fc-Fragment der Antikörper nicht überproportional zum Hintergrundsignal beiträgt. Die Kapazität der mit Fab beschichteten Kugeln betrug nur 20% der mit ganzen IgG-Molekülen erhaltenen Kapazität. Dieser Aktivitätsverlust kann entweder durch den Papainverdau selber, oder durch größere Empfindlichkeit der Fragmente bei der Kopplung bedingt sein.

Standardbedingungen für die Bindung von Antikörpern an Glas

Mit diesen Resultaten wurde das Standardkopplungsprotokoll aufgestellt :

3 h Silylierung der Glaskugeln (1 mm ∅)
3 h Aktivierung mit 1% Glutaraldehyd
12 h Inkubation mit 0.1 mg/ml Antikörper-Lösung

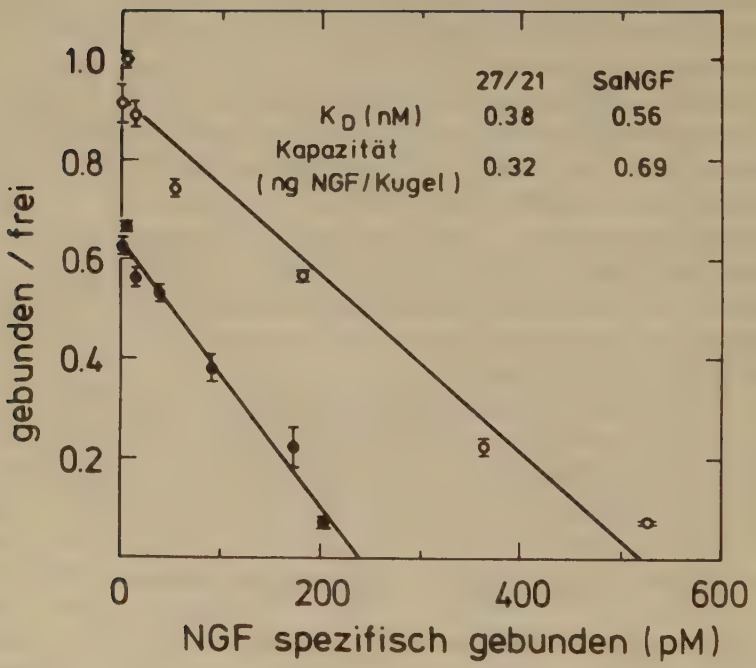


Fig. 8 Bindung von ^{125}I-NGF an spezifische Antikörper

Die gereinigten Antikörper wurden an Glaskugeln gekoppelt und mit 2 pM - 8 nM ^{125}I-NGF 22 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der spezifisch gebundene NGF wurde nach **3.8.** gemessen und die Bindungsdaten nach Scatchard dargestellt. Mittelwerte von Triplikaten ± SEM.

- ● Monoklonaler 27/21-Antikörper
- o Schaf-anti NGF-Antikörper

Affinität und Menge der immobilisierten Antikörper wurden nach **3.8.** gemessen (Fig. 8). Pro Kugel wurden 180±40 pg NGF bei monoklonalen und 730±80 pg NGF bei polyklonalen Antikörpern mit einer Affinität von 0.27±0.04 nM bzw. 0.44±0.16 nM gebunden. Die Affinität der gekoppelten Antikörper war von der Affinität der adsorbierten Antikörper nicht signifikant verschieden. Der Grund für die geringere Kapazität bei Verwendung der monoklonalen Antikörper, verglichen mit polyklonalen Antikörpern, ist vermutlich die Gegenwart von unspezifischem Rinder-Immunglobulin in der 'monoklonalen' Antikörperpräparation (vgl.**4.1.1.**).

Bei 50 µl Testvolumen pro Kugel ergibt sich eine 'Konzentration' von 0.14 bzw. 0.55 nM NGF-Bindungsplätzen. Damit liegen die Antikörper bei der höchsten NGF-Konzentration in der EIT-Standardkurve immer noch in 3 bzw. 11-fachem Überschuß vor.

Mit der Annahme einer glatten Oberfläche und unter Verwendung des weiter oben berechneten Radius für die Antikörpermoleküle ergibt sich für eine monomolekulare Schicht theoretisch eine maximale Belegung mit 3-8 ng Antikörper/Kugel. Aus der NGF-Bindungskapazität der Kugeln kann die Menge an gekoppeltem aktiven Antikörper bestimmt werden; sie beträgt 2 ng/Kugel für Schaf-antiNGF-Antikörper (bei einer Stöchiometrie von 2 NGF/Antikörper). Da ein Teil der Antikörpermoleküle sicher so gekoppelt sein wird, daß seine Antigenbindungsregionen unzugänglich sind, ist die experimentell erhaltene Belegungsdichte als recht gute Annäherung an das theoretische Maximum anzusehen.

Für den an Glaskugeln gekoppelten monoklonalen Antikörper 27/21 wurden die Geschwindigkeitskonstanten nach **3.9.** gemessen, um die optimalen Reaktionszeiten im EIT abschätzen zu können (s. **4.1.4.**). Die Assoziationsrate betrug $2.2 \cdot 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ bei Raumtemperatur und $7.3 \cdot 10^4$ $M^{-1}s^{-1}$ bei 37°C (Fig. 9). Die Dissoziationsrate bei 37°C betrug $3.2 \cdot 10^{-5}$ s^{-1} (Fig. 10), daraus errechnet sich die Halbwertszeit für die Dissoziation zu 6.0 h.

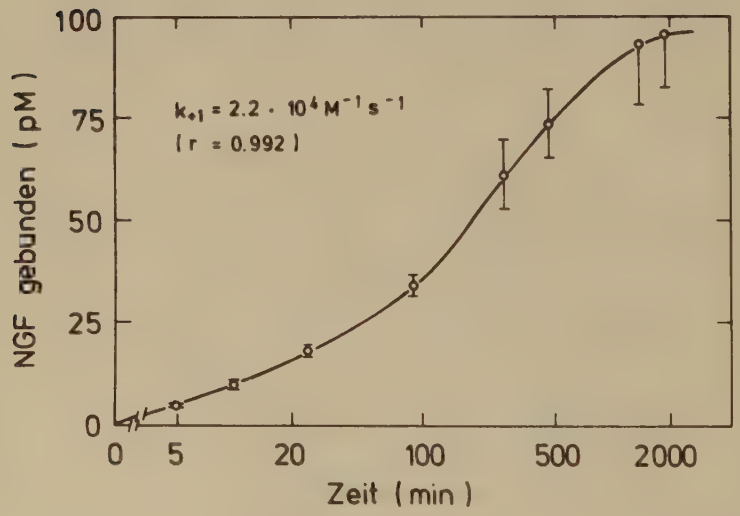


Fig. 9 Assoziation von ^{125}I-NGF an 27/21-Antikörper

27/21-Kugeln wurden mit 2 nM ^{125}I-NGF bei Raumtemperatur inkubiert und die Bindung nach 5 - 1920 min gemessen wie in **3.9.** beschrieben. Die Konzentration an gebundenem NGF wurde gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte von Sechsfachmessungen ± SEM.

Die aus den bei 37°C gemessenen Ratenkonstanten errechnete Dissoziationskonstante

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = 0.44 \text{ nM}$$

liegt dicht bei dem aus Gleichgewichtsmessungen bei Raumtemperatur erhaltenen Wert von 0.27 nM.

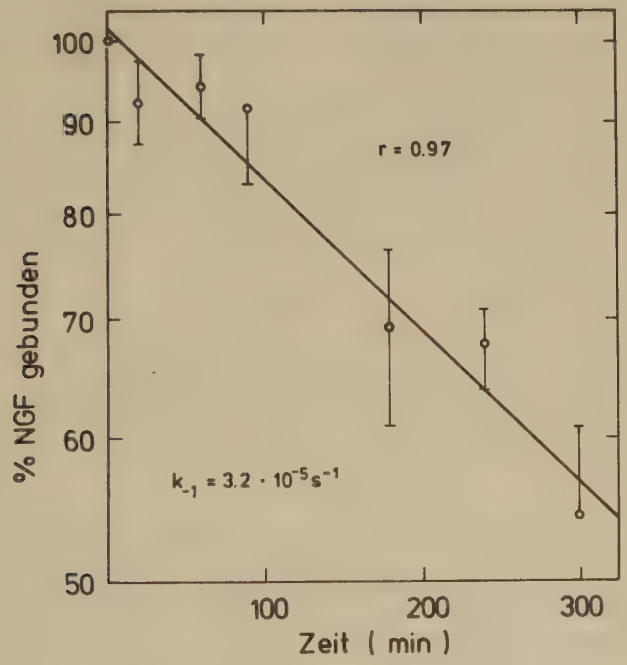


Fig. 10 Dissoziation des ^{125}I-NGF-27/21-Antikörper-komplexes.

27/21-Kugeln wurden über Nacht bei 37°C mit 1 nM ^{125}I-NGF präinkubiert. Die Dissoziation wurde in Gegenwart von 380 nM unmarkiertem NGF im Bereich 20 - 300 min gemessen, wie in **3.9.** beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten ± SEM.

4.1.3. Kopplung von ß-Galaktosidase an den zweiten Antikörper

Die Kopplung wurde durchgeführt wie in Abschnitt **3.13.** beschrieben. 80-100% der Enzymaktivität blieben erhalten, während die Aktivität der Antikörper auf 20-40% sank, gemessen am Verlust der NGF-Bindungsfähigkeit im Protein A-Radioimmuntest (s. **3.10.**). Diese Werte überschätzen allerdings den realen Aktivitätsverlust, da aktive Antikörper, deren Fc-Region durch die Kopplung blockiert ist, mit dieser Methode nicht erfaßt werden (s.u.). Die Aktivität der Kopplungsprodukte im EIT blieb für mindestens ein Jahr unverändert.

Pro Antikörpermolekül wurden 7 Maleimido-Gruppen eingeführt. Diese Anzahl wurde bestimmt durch Umsetzen der Maleimido-Gruppen mit einer begrenzten Menge 2-Merkapto-äthanol und anschließende Messung der restlichen SH-Gruppen mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), wie durch Ellmann (1959) beschrieben.

Ungefähr die Hälfte der Antikörper- und Galaktosidasemoleküle wurden aneinandergekoppelt. Das geht aus der Analyse von Konjugat auf nativen Agarosegelen hervor (Fig. 11). Bei den angewandten Bedingungen (s. **3.11.**) war die Wanderungsgeschwindigkeit der Galaktosidase größer als diejenige des Antikörper-Galaktosidase-Konjugats, während die Antikörper nur geringfügig, teils Richtung Anode, teils Richtung Kathode wanderten. Im Gegensatz zur stark sauren Galaktosidase (pI = 4.6, Wallenfels und Weil 1972) liegt der isoelektrische Punkt von Immunglobulinen im neutralen Bereich (Phelps und Putnam 1960).

Bei der Verwendung der Kopplungsprodukte im EIT variierten Signalhöhe und Hintergrund beträchtlich zwischen verschiedenen Konjugaten, die unter gleichen Bedingungen hergestellt worden waren. Nur die Kopplungsprodukte mit überdurchschnittlichem Signal/Rausch-Verhältnis wurden im EIT verwendet.

Das molare Verhältnis von Antikörper zu Galaktosidase

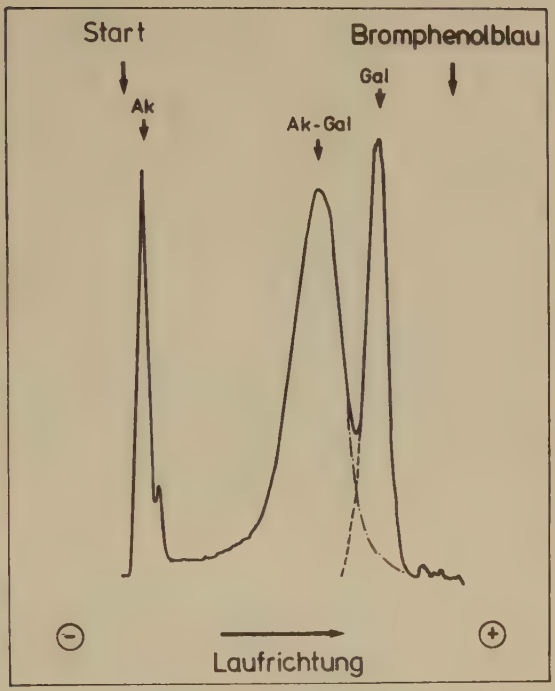


Fig. 11 Agarosegel-Elektrophorese von SaNGF-Gal-Konjugat

Die Elektrophorese wurde nichtreduzierend und nichtdenaturierend durchgeführt wie in **3.11.** beschrieben. 30 µg SaNGF-Gal-Konjugat wurden aufgetragen. Das mit Coomassie Brilliant Blue gefärbte Gel wurde densitometrisch ausgewertet. Die Zuordnung der Peaks ist durch parallele Versuche mit Antikörper alleine bzw. Galaktosidase alleine gesichert.

Ak	freier Antikörper
Gal	freie Galaktosidase
Ak-Gal	Kopplungsprodukt

schwankte im Bereich 0.5 bis 2 wegen der unterschiedlichen Ausbeute von aktiviertem Antikörper auf der Sephadex G25 Säule, was aber nicht mit den Variationen von Signal- und Rauschhöhe im EIT korreliert war.

Der Leerwert im EIT betrug ungefähr das Doppelte des Leerwertes, der mit der entsprechenden Menge reiner Galaktosidase erhalten wurde. Das Hintergrundsignal wird also etwa zu gleichen Teilen durch unspezifische Adsorption von Galaktosidase- und Antikörpermolekülen verursacht.

Um die Empfindlichkeit des EIT zu verbessern, wurde versucht, die Antikörper-Enzym-Konjugate von nicht umgesetzten Antikörper- und Galaktosidasemolekülen zu trennen. Eine Separation durch präparative Agarosegelelektrophorese nach **3.11.** schied aus, da hierbei 80% der Enzymaktivität verloren gingen. Die Reinigung durch Affinitätschromatographie an einer NGF-Säule ist ebenfalls nicht möglich, da die Eluationsbedingungen zum Verlust der Galaktosidaseaktivität führen.

Bei der Auftrennung von 27/21-Galaktosidase-Konjugat über eine Protein A-Agarose-Säule nach **3.3.** sollte nur die freie Galaktosidase nicht gebunden werden. Es wurden aber sowohl im Durchlauf als auch im Eluat aktive Gal-Antikörper-konjugate gefunden. Der Grund sind vermutlich am Fc-Teil modifizierte Antikörper, die dadurch nicht mehr an Protein A binden können.

Da die isoelektrischen Punkte von Galaktosidase und Antikörper verschieden sind (s.o.), wurde das Konjugat bei neutralem pH und variabler Ionenstärke auf dem Anionenaustauscher DEAE-Agarose aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen sollte freier Antikörper nicht gebunden werden, während freie Galaktosidase zum Schluß eluiert wird (O'Sullivan et al. 1979b). Die gemessene Antikörper- und Enzymaktivitätsverteilung bei der Separation von SaNGF-Galaktosidase-Konjugat zeigt, daß diese Auftrennung stattfindet (Fig. 12). Die gesamte Enzymaktivität wurde gebunden, aber nur 42% der Antikörperaktivität. Freier Antikörper kann also abgetrennt werden, die Separation von freier Galaktosidase und

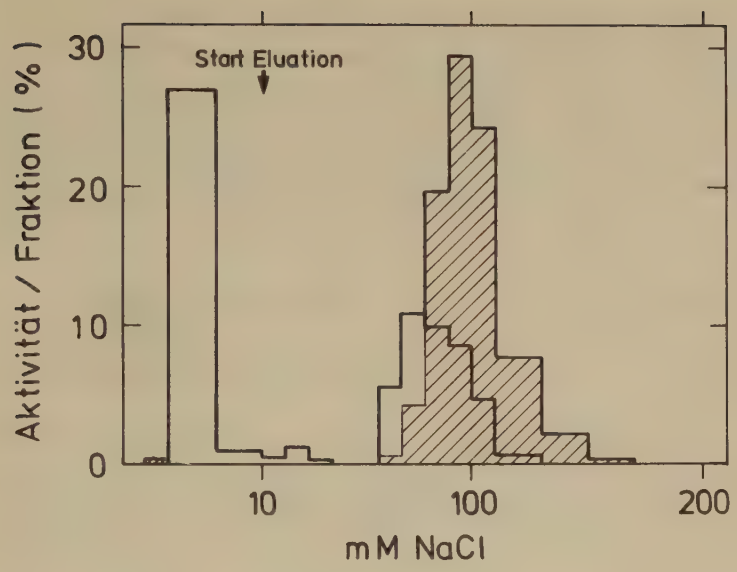


Fig. 12 Auftrennung von SaNGF-Gal-Konjugat auf DEAE-Agarose

200 µl Konjugat wurden auf die Säule aufgetragen. Gewaschen wurde mit 8 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM ß-Merkaptoäthanol; eluiert wurde mit 30 ml eines 14-Stufen-Gradienten (Waschpuffer + 10-200 mM NaCl). Galaktosidaseaktivität (s.3.5.) und Antikörperaktivität im Protein A-Radioimmuntest (s. 3.10.) wurden in 2 ml-Fraktionen getestet. Die Aktivität wird jeweils in Prozent der insgesamt eluierten Aktivität ausgedrückt.

Antikörperaktivität
Galaktosidaseaktivität

Galaktosidase-Antikörper-Konjugat ist nicht möglich (stark überlappende Peaks).

Im EIT war allerdings das Signal/Rausch-Verhältnis der gereinigten Konjugatfraktionen nicht höher als von ungereinigtem Konjugat. Daraufhin wurde auf weitere

Reinigungsversuche verzichtet und bei allen weiteren Versuchen das ungereinigte Kopplungsprodukt verwendet.

Für jede Kopplungsreaktion wurde die Verdünnung ermittelt, die bei einer NGF-Konzentration im mittleren Bereich der Standardkurve noch das optimale Signal/Rausch-Verhältnis im EIT aufwies. Das Hintergrundsignal war über einen weiten

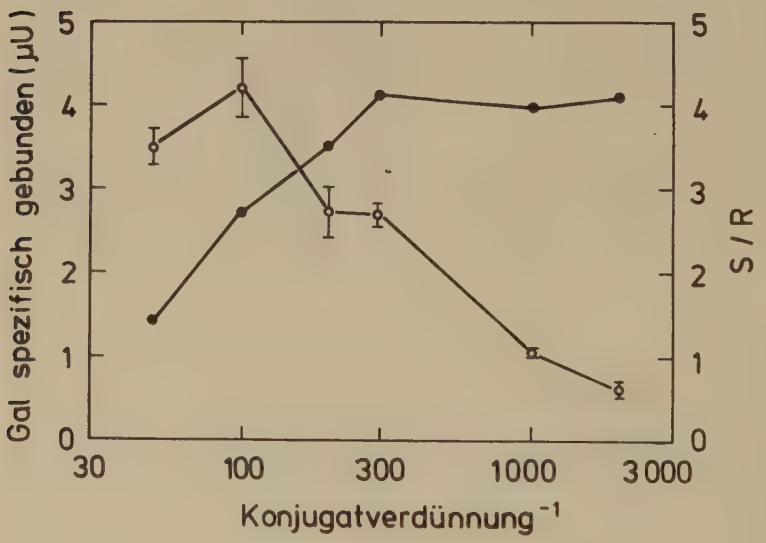


Fig. 13 Die Konzentration des 2.Antikörpers als Variable im EIT

Dargestellt sind das spezifische Signal und das Signal-Rausch-Verhältnis als Funktion der Konzentration des Antikörper-Gal-Konjugats. Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg SaNGF/ml beschichtet,2mal gewaschen und 3 h bei 37°C mit 0 und 0.5 ng NGF/ml inkubiert. Nach 2mal Waschen wurde 3.5 h mit den verschiedenen Konjugatverdünnungen (3 - 120 mU_{MUG} Gal/Test) inkubiert und die gebundene Galaktosidaseaktivität nach 3.5. gemessen.

o spezifisches Signal ± SEM
• Signal/Rausch-Verhältnis

Bereich linear von der Konzentration des Konjugates abhängig, während das spezifische Signal einen ausgeprägten Sättigungswert aufwies (Fig. 13).

Das Hintergrundsignal konnte durch mehr als dreimaliges Waschen nach der Inkubation mit zweitem Antikörper nicht weiter reduziert werden.

4.1.4. Optimierung des EIT

Einfluß des pH

Der EIT wurde bei pH 7.0, 8.0 und 9.0 durchgeführt, d.h. T- und W-Puffer hatten den jeweiligen pH. Mikrotiterplatten wurden mit 1 µg/ml SaNGF beschichtet, 2x gewaschen und mit 2 ng/ml NGF 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion mit dem SaNGF-Gal-Konjugat (0.4 U_{MUG}/ml) wurde 4 h bei 37°C durchgeführt. Die Messung des gebundenen Enzyms erfolgte nach 3.5. Das Hintergrundsignal war zwischen pH 7 und 9 nicht signifikant verschieden, während das spezifische Signal auf die Hälfte abnahm (Tab. 5).

Tab. 5 Signal/Rausch-Verhältnis im EIT in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH	µU Gal spezifisch gebunden bei 2 ng NGF/ml	Hintergrund-signal (µU)	S/R
7.0	4.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	5.0
8.0	3.0 ± 0.4	1.1 ± 0.1	2.8
9.0	1.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	2.4

Angegeben ist die Galaktosidase-Aktivität pro Ansatz

Einfluß der Ionenstärke und der Pufferkonzentration

Eine Erhöhung der Ionenstärke führt zur Abschwächung aller polaren Wechselwirkungen in der Lösung. Es ist denkbar, daß spezifische und unspezifische Bindung von Antikörpermolekülen in unterschiedlichem Ausmaß von polaren Wechselwirkungen abhängen. Daher wurde der Einfluß der Ionenstärke und der Pufferkonzentration auf das Signal/Rausch-Verhältnis im EIT untersucht.

Die Tris-Konzentration im T-Puffer wurde zwischen 25 und 100 mM variiert, die NaCl-Konzentration zwischen 0 und 400 mM. Der EIT wurde unter Standardbedingungen, aber ohne Zusatz von Rattenserum im T-Puffer, durchgeführt.

Das spezifische Signal wies keine signifikante Tendenz innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs auf, während das Hintergrundsignal sowohl bei der höchsten Tris- als auch der höchsten und der niedrigsten NaCl-Konzentration signifikant zunahm. Minimale unspezifische Bindung und daher maximales Signal/Rausch-Verhältnis wurden bei 50 mM Tris und 200 mM NaCL erhalten.

Tab. 6 Signal/Rausch-Verhältnis im EIT als Funktion der Ionenstärke und der Pufferkonzentration

Modifikation im T-Puffer	nU Gal spezifisch gebunden bei 0.32 ng NGF/ml	Hintergrund-signal (nU Gal)	S/R
25 mM Tris *	404 ± 46	67 ± 4	6.0
50 mM Tris *	501 ± 39	59 ± 6	8.6
100 mM Tris *	500 ± 27	106 ± 10	4.7
0 mM NaCl **	390 ± 91	196 ± 26	2.0
200 mM NaCl **	404 ± 46	67 ± 4	6.0
400 mM NaCl **	421 ± 27	155 ± 15	2.7

* 200 mM NaCl
** 25 mM Tris

Einfluß des Detergens

Nichtionische Detergentien sollten unspezifische unpolare Wechselwirkungen zwischen der festen Phase und gelösten Makromolekülen verringern. Triton X 100, Tween 20 und 1-O-n-Octyl-ß-D-glucosid wurden auf ihre Eignung überprüft und jeweils in T- und W-Puffer verwendet. Der EIT wurde unter Standardbedingungen, aber ohne Rattenserum durchgeführt.

Sowohl Tween 20 als auch Oktylglukosid wiesen deutlich höhere Hintergrundsignale als Triton X 100 auf (Tab. 7). Die Erhöhung der Triton X 100 Konzentration über 0.1% hinaus brachte keine weitere Verbesserung. Das Signal/Rausch-Verhältnis bei Triton X 100 und Oktylglukosid war nicht signifikant verschieden; aus Kostengründen wurde Triton X 100 beibehalten.

Tab. 7 Signal/Rausch-Verhältnis im EIT in Abhängigkeit vom eingesetzten Detergens

Detergens	nU Gal spezifisch gebunden bei 0.16 ng NGF/ml	Hintergrund-signal (nU Gal)	S/R
0.1% Triton X 100	248 ± 20	32 ± 4	7.8
0.25% Triton X 100	254 ± 6	36 ± 3	7.1
0.1% Tween 20	245 ± 35	51 ± 9	4.8
0.2% Octylglukosid	569 ± 35	59 ± 4	9.6

Angegeben ist die Galaktosidase-Aktivität pro Ansatz

Einfluß von Serum

Serum enthält verschiedene Trägermoleküle, die unspezifische Adsorption im EIT verringern könnten. Nachdem sichergestellt war, daß Rattenserum keinen NGF enthält (Tab. 9); wurden 5% oder 10% Rattenserum während der Inkubation mit erstem (I), zweitem (II), oder beiden Antikörpern dem T-Puffer zugesetzt (vgl. Fig. 3 für die Zuordnung der Reaktionsschritte). Der Leerwert im EIT sank in allen Fällen drastisch, während das Signal nicht beeinflußt wurde (Tab. 8). Der kleinste Effekt wurde durch Zusatz von Rattenserum in Reaktionsschritt I erreicht. In Kombination mit Rattenserum im 2. Reaktionsschritt hatte der Zusatz im 1. Reaktionsschritt gar keinen Effekt. Optimal waren 10% Rattenserum in der Inkubation II.

Das Hintergrundsignal von Gewebsproben (vgl. **4.1.7.**) auf mit unspezifischen Antikörpern beschichteten Kugeln wurde durch Rattenserum ebenfalls reduziert.

Tab. 8 Einfluß von Rattenserum im T-Puffer auf das Signal/Rausch-Verhältnis im EIT

Rattenserum (%)	in Reaktionsschritt	nU Gal spezifisch gebunden bei 0.16 ng NGF/ml	Hintergrundsignal (nU Gal)	S/R
0	-	322 ± 26	63 ± 8	5
5	I	360 ± 32	37 ± 5	10
5	II	388 ± 66	8.5 ± 0.3	46
5	I,II	388 ± 66	8.1 ± 0.5	48
10	II	344 ± 14	6.9 ± 0.4	50

Angegeben ist die Galaktosidase-Aktivität pro Ansatz; der EIT wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

Inkubationszeiten

Die Reaktion mit dem ersten Antikörper kann theoretisch bis zum Gleichgewicht geführt werden, da die maximale NGF-Bindung im Gleichgewicht auftritt. Wegen der Gefahr von Proteolyse und Denaturation wurde die Reaktionsdauer auf 20 h bei Raumtemperatur beschränkt, obwohl dabei das Gleichgewicht bei den im EIT verwendeten NGF-Konzentrationen noch nicht erreicht war. Das Gleichgewicht stellt sich um so langsamer ein, je kleiner die Konzentrationen der Reaktanden sind, z.B. sind bei 10 pg/ml NGF nach 20 h bei Raumtemperatur erst 35% der Gleichgewichtsbindung erreicht (aus der Bestimmungsgleichung für k_{+1} berechnet).

Die Situation bei der Reaktion mit dem zweiten Antikörper ist unübersichtlicher, da hier mehrere, teilweise gegenläufige Prozesse ablaufen :
Bildung und Zerfall von NGF-Antikörper-NGF-Komplexen können vernachlässigt werden, da hierbei die (kleine) NGF-Konzentration ins Quadrat eingeht.
(erwünschte Produkte fettgedruckt)

)-A--NGF + A-Gal ⟷ **)-A--NGF--A-Gal**

)-A--NGF ⟷)-A + NGF

A-Gal + NGF ⟷ NGF--A-Gal

)-A + NGF--A-Gal ⟷ **)-A--NGF--A-Gal**

A-Gal + NGF--A-Gal ⟷ A-Gal--NGF--A-Gal

)-A	1. Antikörper
A-Gal	2. Antikörper-Galaktosidase-Konjugat
--	nicht kovalente Bindung

Daher wurde der EIT mit verschiedenen Inkubationszeiten für den 2. Antikörper im Bereich 5 min - 3 h durchgeführt.

Die Konzentration an erwünschtem Endprodukt hat einen klaren Sättigungswert, der je nach Konzentration des 2. Antikörpers nach 1-3 h erreicht wurde (Fig. 14). Bei höheren Konjugat-Konzentrationen war das maximale Signal höher und wurde früher erreicht. Da mit längeren Inkubationszeiten nur das Hintergrundsignal noch anstieg, wurde eine Standard-inkubationszeit von 2 h gewählt und die Konjugatkonzentration für diese Zeit optimiert (vgl. Fig. 13).

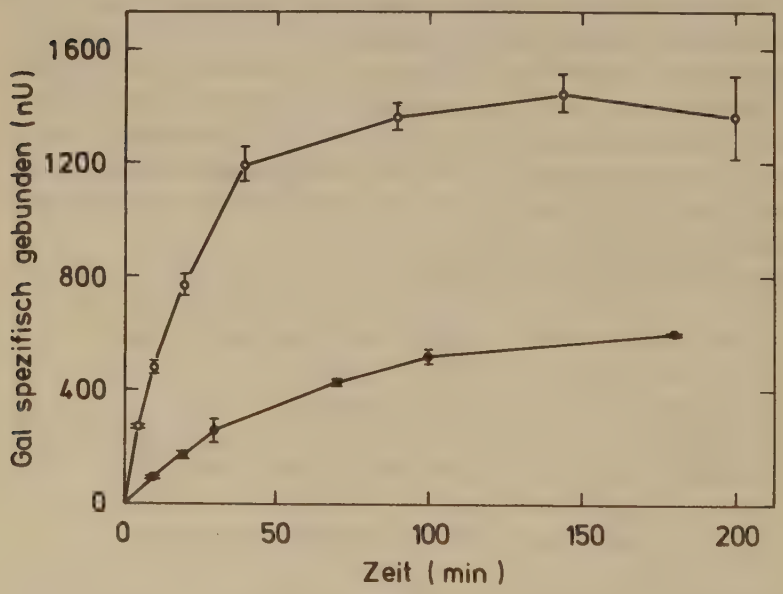


Fig. 14 Zeitverlauf der Reaktion mit dem 2. Antikörper

Der EIT wurde unter Standardbedingungen mit 0 und 0.5 ng NGF/ml durchgeführt. Aufgetragen wurde das spezifische Signal als Funktion der Inkubationsdauer mit dem Antikörper-Gal-Konjugat (5 - 200 min).
Mittelwerte von Quadruplikaten ± SEM

- o 27/21-Gal-Konjugat (120 mU_{MUG} Gal/Test)
- • 27/21-Gal-Konjugat (30 mU_{MUG} Gal/Test)

4.1.5. Standardbedingungen im EIT

eine antikörperbeschichtete Glaskugel
50 µl NGF-Standard oder Gewebsprobe
in T-Puffer, pH 7.0 + Proteaseinhibitoren

I ↓ 20 h bei Raumtemperatur,
3x Waschen mit je 200 µl W-Puffer

+ 50 µl Antikörper-Galaktosidase-Konjugat
in T-Puffer, pH 7.0 + 10% Rattenserum
(5-20 mU_{MUG} Galaktosidase und 10-20 ng Antikörper pro Test)

II ↓ 2 h bei 37°C
2x Waschen mit je 200 µl W-Puffer
1x Waschen mit 150 µl 0.1 M NaP_i, pH 7.3, 1 mM $MgCl_2$

Transfer der Kugel in neues Reagenzröhrchen (Polystyrol, 3.5 ml)
mit 50 µl 100 µM MUG in 0.1 M NaP_i, pH 7.3, 1 mM $MgCl_2$

III ↓ 20 h bei 37°C im Dunkeln

Stopp der Enzymreaktion und Fluoreszenzmessung

Der EIT wurde entweder mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern durchgeführt, wobei derselbe Antikörper für beide Seiten benutzt wurde. Das ist möglich, weil NGF aus zwei identischen Untereinheiten besteht (vgl. Thoenen und Barde 1980). Für jeden Versuch wurde eine Standardkurve im Bereich 2.5 pg - 1.28 ng NGF/ml gemessen (Fig. 15). Die Bestimmungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Um Verdunstungsverluste bei den kleinen Probevolumina zu vermeiden, wurden die Inkubationen in geschlosssenen Wasserbädern durchgeführt. Es wurde bei 0.5 Hz geschüttelt, um Diffusionseffekte auszuschließen.

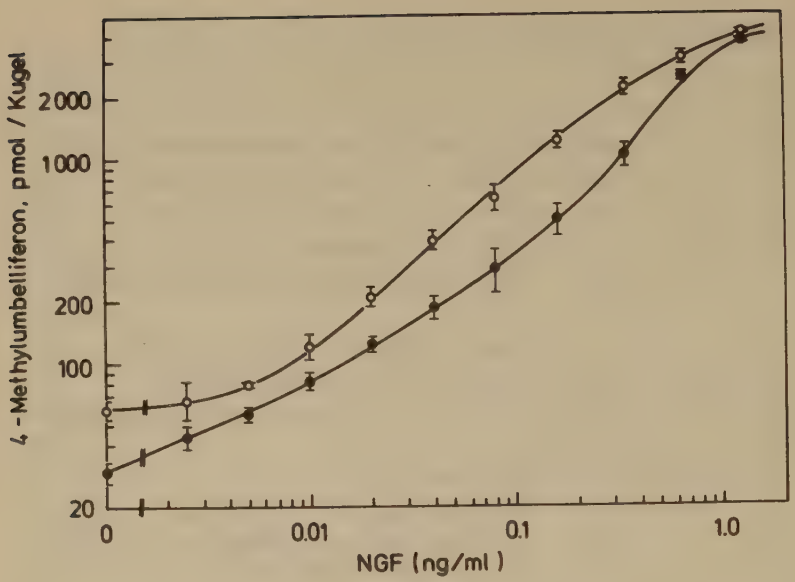


Fig. 15 Eichkurven für Maus-NGF

Der EIT wurde unter Standardbedingungen durchgeführt und die gebundene Galaktosidase-Aktivität als Funktion der eingesetzten NGF-Konzentration (2.5 pg - 1.28 ng/ml) aufgetragen. Galaktosidase wurde durch die Menge von freigesetztem 4-Methylumbelliferon ausgedrückt. Mittelwerte von Quadruplikaten ± SEM.

o Polyklonale Schafantikörper; 24 h Inkubation mit MUG
● Monoklonaler 27/21-Antikörper; 15 h Inkubation mit MUG

$5 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-7}$ Teile der eingesetzten Galaktosidase-aktivität wurden unspezifisch gebunden (Hintergrundsignal), abhängig von Antikörper- und Konjugat-Präparation. Das maximale spezifische Signal bei 1.28 ng NGF/ml war 300mal höher als das Hintergrundsignal. Der Meßbereich eines Versuchs umfaßt somit Konzentrationsunterschiede von mehr als zwei Größenordnungen.

Da die Aktivität der Galaktosidasemoleküle durch die Kopplung an Antikörper nicht verändert wurde (s.**4.1.3.**), kann aus der Standardkurve berechnet werden, wieviel Enzymmoleküle pro eingesetztem NGF-Molekül gebunden wurden. In der Nähe der Nachweisgrenze sind dies 1-2%. Die Nachweisgrenze wurde als diejenige NGF-Konzentration definiert, die im EIT ein Signal/Rausch-Verhältnis von 1 ergab. Sie betrug 5 pg/ml (0.2 pg/Test) für den monoklonalen Antikörper und 10 pg/ml (0.5 pg/Test) für den polyklonalen SaNGF-Antikörper, was 0.01 und 0.02 fmol NGF/Test entspricht (Fig. 15).

4.1.6. Spezifität des EIT

Verschiedene Substanzen, die NGF ähnlich sind in Bezug auf isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht (Cytochrom c, Aprotinin und ß-Bungarotoxin), Sequenzhomologien aufweisen (Insulin, Sabesan 1980) oder als NGF-Kontamination verdächtigt wurden (Maus-IgG, Carstairs 1977), wurden in der Konzentration 10 µg/ml im EIT eingesetzt, um seine Spezifität zu überprüfen. Das resultierende Signal war mit einer Ausnahme bei poly- und monoklonalen Antikörpern nicht vom Hintergrundsignal verschieden. Maus-IgG ergab auf SaNGF-Antikörpern ein spezifisches Signal, das ungefähr 0.5% Antikörper gegen Maus-IgG in der SaNGF-Präparation entsprach. Dieser kleine Prozentsatz kann in herkömmlichen Reinheitstests wie Immunodiffusion nicht mehr nachgewiesen werden. Da aber die Konzentration von IgG in Serum und Organen mit Sicherheit höher ist als die zu erwartenden NGF-Konzentrationen, sind falschpositive Ergebnisse bei der NGF-Messung mit polyklonalen Antikörpern in Mäuseorganen zu erwarten. Daher wurde die NGF-Bestimmung in Mäusegeweben nur mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

4.1.7. Messung von NGF in Geweben und Blut

Um eine möglichst weitgehende Zerkleinerung der Gewebe zu erhalten, wurden Glas/Glas-Homogenisatoren benutzt (keine Rotation, 10-20 Zyklen). Größere Gewebestücke wie Herzventrikel wurden vorher mit einer Schere zerkleinert. Die Iris wurde ohne Zusatz von Puffer seziert, um Diffusionsverluste zu vermeiden.

Der Homogenisierpuffer enthielt kein Detergens, um allgemein die Solubilisierung von zusätzlichem Protein zu vermeiden, und insbesondere, um eine mögliche Solubilisierung von NGF-Rezeptoren und Fc-Rezeptoren zu vermeiden, die beide im EIT stören würden. Dagegen waren große Proteinkonzentrationen vorhanden (je 2% BSA und Gelatine), um dem bekanntermaßen adsorptionsfreudigen NGF-Molekül (Pearce 1973) genügend lösliche Bindungsplätze anzubieten. Sowohl Albumin als auch Kollagen,der Hauptbestandteil von Gelatine, binden NGF (Almon und Varon 1978; Rohrer, persönliche Mitteilung). Die hohe NaCl-Konzentration im H-Puffer (0.4 M) dient zur Reduktion unspezifischer polarer Wechselwirkungen. Die Mischung von Proteaseinhibitoren (s.3.2.) wurde dem H-Puffer unmittelbar vor dem Homogenisieren zugesetzt. Das in der Mischung enthaltene hydrolyseempfindliche Phenylmethansulfonylfluorid wurde in einer separaten Vorratslösung in Dimethylsulfoxid angesetzt.

Das Homogenat wurde in 200 µl fassenden Ultrazentrifugenröhrchen bei 10^5 g und 15°C 10 min zentrifugiert (Ultra Clear Röhrchen, Beckman Ultrazentrifuge, SW50.1 Rotor mit Adaptoren) und der klare Überstand mit 0.2% Triton X 100, 20 mM $CaCl_2$ 1:1 verdünnt, um die Zusammensetzung des T-Puffers zu erreichen, der für die NGF-Standard-Lösungen verwendet wurde.

Zur Verringerung von Adsorptionsverlusten wurden alle Glas- und Plastikgefäße, mit denen das Homogenat in Berührung kam, vor der Verwendung mit H- oder W-Puffer

abgesättigt.

Um abschätzen zu können, welcher Anteil des endogenen NGF bei der Messung erfaßt wird, wurde den Gewebehomogenaten 0.05 - 0.3 ng/ml Maus-NGF zugesetzt, wodurch das jeweilige Probensignal ungefähr verdoppelt wurde. Der wiedergefundene Prozentsatz von exogenem NGF (Recovery) wurde zur Korrektur des gemessenen endogenen NGF-Gehalts verwendet. Bei Zugabe von exogenem NGF in den Überstand nach der Zentrifugation wurden irreführend hohe Werte für die Recovery erhalten, da dabei die Adsorption von NGF an die unlöslichen Probenbestandteile nicht berücksichtigt wird.

Blut wurde sofort nach der Gewinnung mit 100 U/ml Aprotinin und 5 mM EDTA versetzt,um Einfluß von Proteasen zu minimieren. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde das Blut über Nacht bei 4°C stehen gelassen und dann bei 10^4 g 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit doppeltkonzentriertem T-Puffer verdünnt.

Für die Bestimmung der Recovery wurde 0.1 ng NGF pro ml Blut zugesetzt.

Die Proben wurden mit monoklonalen und polyklonalen Schaf-antiNGF-Antikörpern im EIT untersucht. IgG aus Präimmunseren von Schaf und Maus und zwei monoklonale Antikörper gegen Kontaminanten in der Standardpräparation von Rinder-NGF (Antigen nicht identifiziert) wurden in gleicher Weise wie die antiNGF-Antikörper an Glaskugeln gebunden und dienten zur Abschätzung des Hintergrundsignals der Gewebsproben.

Kugeln mit NGF-spezifischen und unspezifischen Antikörpern hatten ungefähr dasselbe Hintergrundsignal, wenn der EIT in dem Puffer durchgeführt wurde, der für die Probenherstellung verwendet wurde (T-Puffer). Demgegenüber war das Hintergrundsignal der Kugeln mit unspezifischen Antikörpern 1.5-10fach höher (abhängig von Gewebe und Homogenatkonzentration), wenn sie mit Gewebsproben inkubiert wurden. Dieses

falschpositive Signal entspricht einer NGF-Konzentration bis zu 0.05 ng/ml und mußte daher von dem Gesamtsignal abgezogen werden, das bei der Inkubation der Gewebsproben mit Kugeln mit NGF-spezifischen Antikörpern gemessen wird.

Da die Antikörper im zweiseitigen EIT in großem Überschuß vorliegen, ist eine unspezifische, aber kinetisch stabile Adsorption von Probenbestandteilen an Antikörpermoleküle die wahrscheinlichste Erklärung für dieses falschpositive Signal, das wegen der Sensitivität der Nachweismethode hier sichtbar wird.

Die Proben wurden nur dann als NGF-positiv gewertet, wenn bei polyklonalen und monoklonalen Antikörpern das spezifische Signal mindestens 50% des Hintergrundsignals betrug und gleichzeitig in den Meßbereich der Standardkurve fiel. Da die Nachweisgrenze in der Standardkurve 5-10 pg NGF/ml betrug, waren damit minimal 3-6 pg NGF für eine Bestimmung des NGF-Gehalts in einem Gewebe ausreichend. Der minimal meßbare NGF-Gehalt betrug 0.05 ng NGF/g Feuchtgewicht. Bei einem geschätzten Proteinanteil von 10% des Feuchtgewichts bedeutet das, daß NGF noch bei einem $2 \cdot 10^9$-fachen Überschuß von Fremdproteinen bestimmt werden kann.

Die gemessene NGF-Konzentration hing linear von der Konzentration des Homogenats ab.

4.2. Anwendung des Enzymimmuntests

4.2.1. NGF-Gehalt in Organen von Ratte und Maus

Die Experimente wurden mit 1.5-3 Monate alten Tieren durchgeführt. (Die Wirkung von exogenem NGF und die von NGF-Antikörpern ist nicht auf die perinatale Periode beschränkt, sondern wird auch bei adulten Tieren beobachtet, vgl. Thoenen und Barde 1980).

Um Kontaminationen durch den extrem hohen NGF-Gehalt der Mausspeicheldrüse auszuschließen, wurden zunächst Rattenorgane untersucht (Wistarratten beiden Geschlechts, 100-200 g schwer). Da die verwendeten Antikörper gegen Maus-NGF gerichtet sind, wird der NGF-Gehalt der Rattenorgane in Maus-NGF-Äquivalenten angegeben. Die weitgehende Immunosympathektomie in Ratten mit Antikörpern gegen Maus-NGF beweist die gute Kreuzreaktivität zwischen antiMaus-NGF-Antikörpern und Ratten-NGF (vgl. Harper und Thoenen 1981), so daß die Maus-NGF-Äquivalente als recht genaues Maß für den Ratten-NGF angesehen werden können.

Der NGF-Gehalt von Organen der Ratte wurde mit monoklonalen und in einigen Fällen auch mit polyklonalen Schafantikörpern bestimmt. Die Ergebnisse beider Methoden waren nicht signifikant verschieden ($P<0.9$), deswegen wird nur der Mittelwert beider Bestimmungen für jedes Gewebe aufgeführt. In einigen Geweben wurde der NGF-Gehalt in männlichen und weiblichen Tieren getrennt gemessen; in keinem dieser Gewebe war der NGF-Gehalt geschlechtsabhängig ($P<0.7$).

Der höchste NGF-Gehalt wurde in den sympathischen Ganglien festgestellt (Tab. 9). Sympathisch innervierte Organe und sensorische Ganglien enthielten etwa eine Größenordnung weniger NGF. Der NGF-Gehalt der Zielorgane war in den meisten Fällen mit der Dichte der sympathischen Innervation positiv korreliert (vgl. Holzbauer und Sharman 1972). Dicht innervierte Organe wie Samenleiter, Iris, Herzvorhof und Speicheldrüse enthielten mehr NGF als weniger

Tab. 9 NGF-Gehalt in Organen der Ratte **in vivo**

Organ	pg NGF * / Organ	ng NGF * / g Feuchtgewicht	Recovery (%) **
Samenleiter	-	2.1 ± 0.2	58
Iris +	1.7 ± 0.3	1.9 ± 0.3	84
Herzvorhof +	14 ± 2	1.0 ± 0.1	50
Submandibulare + Speicheldrüse	85 ± 11	0.5 ± 0.1	110
Epiphyse	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	63
Herzventrikel	150 ± 30	0.25 ± 0.06	68
Leber +	-	0.13 ± 0.04	57
Skelettmuskel	-	< 0.1	44
Serum +	-	< 0.05 ng/ml	69
Oberes Zervikal- + ganglion	42 ± 7	25 ± 4	86
Stellarganglion +	31 ± 5	19 ± 3	100
Spinalganglien ++	4.3 ± 0.7	3.0 ± 0.2	94
Dorsale Wurzeln	-	< 0.05	49
Trigeminalganglion	8.2 ± 1.4	0.5 ± 0.1	100
Ischiasnerv	-	2.8 ± 0.2 ¤	70

* Der gemessene NGF-Gehalt wurde um die entsprechende Recovery korrigiert. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen.

** bei 0.05-0.25 ng/ml zugesetztem Maus-NGF bestimmt

\+ Bestimmungen mit monoklonalem Antikörper 27/21 und mit polyklonalen Schaf-antiNGF-Antikörpern; getrennte Messung von weiblichen und männlichen Tieren.

++ aus den lumbaren und thorakalen Segmenten

¤ Kontrollwert der Ligaturexperimente (s. 4.2.2.)

stark innervierte Organe wie Herzventrikel und Leber. Im fast nicht sympathisch innervierten Skelettmuskel wurde kein NGF gefunden (< 0.1 ng/g Feuchtgewicht). Eine Ausnahme bildet die Epiphyse, deren NGF-Gehalt trotz dichter sympathischer Innervation (Kappers 1960) relativ niedrig ist (Tab. 9).

Der Samenleiter, der von den 'kurzen' adrenergen Neuronen innerviert wird (Sjöstrand 1965), wies von allen untersuchten Zielorganen den höchsten NGF-Gehalt auf. Diese Neuronen reagieren zwar auf NGF-Gabe, jedoch nicht auf die Antikörper gegen NGF (Goedert et al. 1978), was aber möglicherweise nur auf Diffusionsschwierigkeiten der Antikörper beruht.

Der Ischiasnerv enthielt etwa soviel NGF wie die Spinalganglien. Im Gegensatz dazu lag der NGF-Gehalt in den dorsalen Wurzeln der Spinalganglien unter der Nachweisgrenze (<0.05 ng NGF/g Feuchtgewicht).

Blut enthielt keine meßbaren Mengen NGF (< 0.05 ng/ml).

Die Bestimmung des NGF-Gehalts durch Test der biologischen Aktivität wurde nur beim SCG durchgeführt, das von allen mit EIT untersuchten Geweben die höchste NGF-Konzentration aufwies. Meßparameter war das Neuritenwachstum von Spinalganglien in Explantatkultur (Fenton 1970). Wegen der erforderlichen Verwendung konzentrierter Homogenate war das Kulturmedium opak, so daß die Auswertung mit großen Streuungen behaftet war. Der NGF-Gehalt schwankte zwischen 0.002 und 0.01 biologischen Einheiten pro SCG, was 10-70 pg NGF pro SCG entspricht (Fig. 16). Das Neuritenwachstum war durch 10 µg/ml affinitätsgereinigte polyklonale Schafantikörper vollständig blockierbar (Fig. 16).

In Anbetracht der geringen Meßgenauigkeit bei der Bestimmung der biologischen Aktivität von NGF im SCG stimmen die Resultate der biologischen und immunologischen NGF-Messung überein (vgl. Tab. 9). Dadurch wird bestätigt, daß die immunologische Messung (EIT) das biologisch relevante Material (Ratten-NGF) erfaßt.

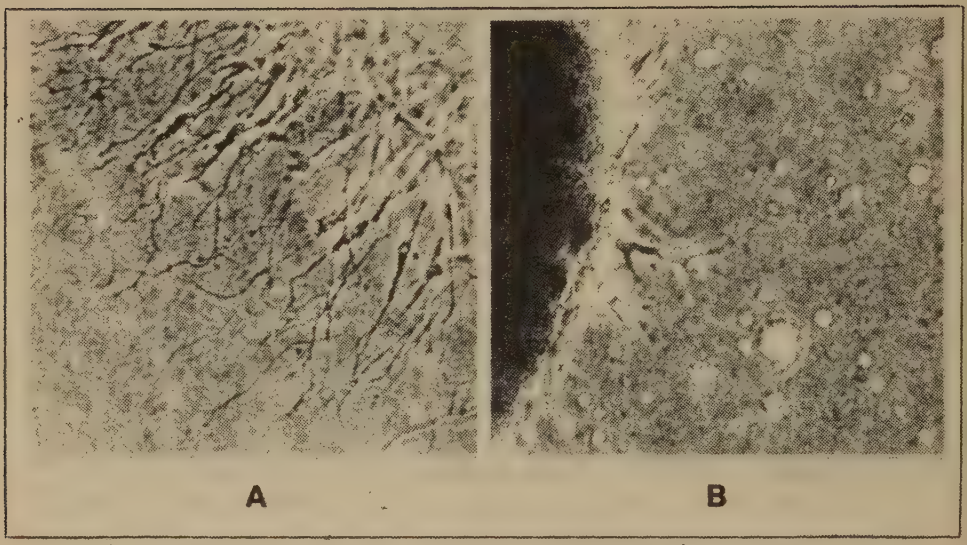


Fig. 16 Biologische Aktivität von NGF im SCG der Ratte

Neuritenwachstum von Spinalganglien mit SCG-Extrakt. Präparation des Extrakts und NGF-Messung erfolgten wie in **3.18.** beschrieben.

A SCG-Extrakt
B SCG-Extrakt + 10 µg/ml SaNGF

NGF-Gehalt in Geweben der Maus

Um die Ergebnisse bei der Ratte zu überprüfen, wurde die Untersuchung des NGF-Gehalts auf Organe der Maus ausgedehnt. Hier wurden die NGF-Messungen auf Herzvorhof, Herzventrikel und Skelettmuskel beschränkt, die ohne Kontaminationsrisiko entnommen werden konnten. Die extrem großen NGF-Mengen, die in der Speicheldrüse der Maus produziert werden (s.Tab. 10), werden in den Speichel sezerniert (vgl. Thoenen und Barde 1980), und können somit durch Belecken auf die gesamte Körperoberfläche der Maus gelangen. Die Gefahr von Kontaminationen durch NGF aus dem Speichel wird dadurch drastisch illustriert, daß in anfänglichen Messungen bis zu

2 ng NGF/ml Serum bei männlichen Mäusen gefunden wurde, obwohl das Blut aus dem Äthanol-gewaschenen Schwanz entnommen wurde. Es erwies sich als nötig, den Schwanz vor der Blutentnahme extensiv in T-Puffer zu waschen, um Verschleppungen des äußerlich anhaftenden NGF zu vermeiden.

Im dichter innervierten Herzvorhof ist die NGF-Konzentration wie bei der Ratte höher als im Ventrikel, während der fast nicht sympathisch innervierte Skelettmuskel keinen nachweisbaren NGF enthält (< 0.3 ng NGF/g Feuchtgewicht) (Tab. 10).

Im Unterschied zur Speicheldrüse, bei der der NGF-Gehalt im männlichen Organ 80mal höher ist als im weiblichen, war der NGF-Gehalt in allen anderen Organen nicht geschlechtsabhängig (Tab. 10). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß auch bei der Maus der NGF-Gehalt in den sympathisch innervierten Organen nicht von der Speicheldrüse herrührt, sondern in den Organen selber produziert wird. Der NGF-Gehalt im Serum betrug 0.10 ng/ml für männliche und 0.04 ng/ml für weibliche Mäuse. Dieselbe Überlegung auf das Blut angewandt legt nahe, daß NGF durch fehlgelenkte Exocytose der sekretorischen Zellen der Speicheldrüse ins Blut gelangt (vgl. Harper und Thoenen 1980). Beide Interpretationen werden durch Sialektomie-Experimente bestätigt. Nach Excision der Speicheldrüse bei männlichen Tieren fällt der NGF-Gehalt im Blut unter den der weiblichen Tiere auf 0.03 ng NGF/ml, während der NGF-Gehalt in Herzventrikel und Herzvorhof nicht absinkt ($P<0.2$, untersuchter Zeitbereich 2 d - 2 mon nach Sialektomie).

Die Absolutkonzentrationen im Herz der Maus waren etwa 4mal größer als in der Ratte. Diese Differenz kann einen wahren Konzentrationsunterschied widerspiegeln, könnte aber auch auf nicht vollständige Kreuzreaktion der antiMaus-NGF-Antikörper mit dem Ratten-NGF zurückzuführen sein.

Tab. 10 NGF-Gehalt * in Organen der Maus **in vivo**

Organ	ng NGF / g Feuchtgewicht	Recovery (%)	männlich / weiblich
Herzvorhof	3.3 ± 0.8	50	1.3 **
Herzventrikel	1.3 ± 0.1	44	0.9 **
Skelettmuskel	< 0.3	65	-
Submandibulare Speicheldrüse +	480000 ± 27000	100	80
Serum +	0.10 ± 0.01 ng/ml	59	3

* Die Untersuchung erfolgte nur mit dem monoklonalen Antikörper 27/21. Es wurden Swiss Albino Mäuse beiden Geschlechts verwendet, mit Ausnahme der angegebenen Fälle. Der gemessene NGF-Gehalt wurde um die entsprechende Recovery korrigiert (bei 0.1-0.3 ng/ml exogenem Maus-NGF bestimmt). Die Daten sind Mittelwerte ± SEM.

** nicht signifikant von 1 verschieden, $P<0.7$

\+ nur männliche Tiere

Insgesamt werden durch die bei der Maus erhaltenen Resultate die mit Ratten gewonnenen Ergebnisse sowohl hinsichtlich Spezifität des Vorkommens als auch Korrelation mit der sympathischen Innervationsdichte bestätigt. Damit ist klar, daß beide Befunde nicht auf die Ratte beschränkt sind.

4.2.2. Mechanische Blockade des axonalen Transports im Ischiasnerv

Um zu überprüfen, ob die sympathischen und sensorischen Ganglien tatsächlich von den innervierten Organen mit NGF

versorgt werden, wurde der axonale Transport im Ischiasnerv der Ratte durch eine Ligatur unterbrochen und der NGF-Gehalt proximal und distal zur Ligatur untersucht. Der Ischiasnerv wurde ausgewählt, weil er groß und gut zugänglich ist.

Die Ligatur wurde durchgeführt wie in **3.14.** beschrieben. Die Ratten wurden 7, 12, 24 und 48 h nach dem Eingriff dekapitiert und je drei 2mm lange Segmente wurden auf beiden Seiten der Ligatur entnommen. Entsprechende Abschnitte im kontralateralen Ischiasnerv wurden als Kontrolle verwendet. Der NGF-Gehalt der Segmente wurde gemessen, wie in **4.1.5.** und **4.1.7.** beschrieben. Der Kontrollwert war nicht von der Zeitspanne nach der Ligatur abhängig. Bei der Zugabe von 0.1 ng/ml exogenem NGF zum Homogenat wurden im Mittel 70% der zugefügten NGF-Menge wiedergefunden.

NGF wurde auf der distalen Seite der Ligatur angehäuft. Die Akkumulation war in den ersten 12 h nach der Operation annähernd linear, so daß der NGF-Gehalt auf das 13-fache des Kontrollwertes stieg (Fig. 17). Zwischen 12 und 48 h erfolgte kein weiterer signifikanter Anstieg ($P<0.8$). Das könnte daran liegen, daß sich nach 12 h ein Gleichgewicht zwischen retrogradem Transport und Abbau eingestellt hat. Wahrscheinlicher ist, daß die zunehmende Degeneration des abgeschnittenen Nervenstumpfs nach 12 h den axonalen Transport zum Erliegen bringt. Vergleichbare Zeiten für die Degeneration der peripheren Nervenstümpfe in der Ratte wurden von Lubińska (1975) beschrieben. Zwischen 92 und 97% des akkumulierten NGF waren während der gesamten Beobachtungsdauer auf das 2mm Segment unmittelbar distal zur Ligatur beschränkt (Fig. 17). Der NGF-Gehalt im distal anschließenden Segment stieg kontinuierlich auf maximal 200% des Kontrollwertes, während im äußersten distalen Segment der NGF-Gehalt unverändert blieb.

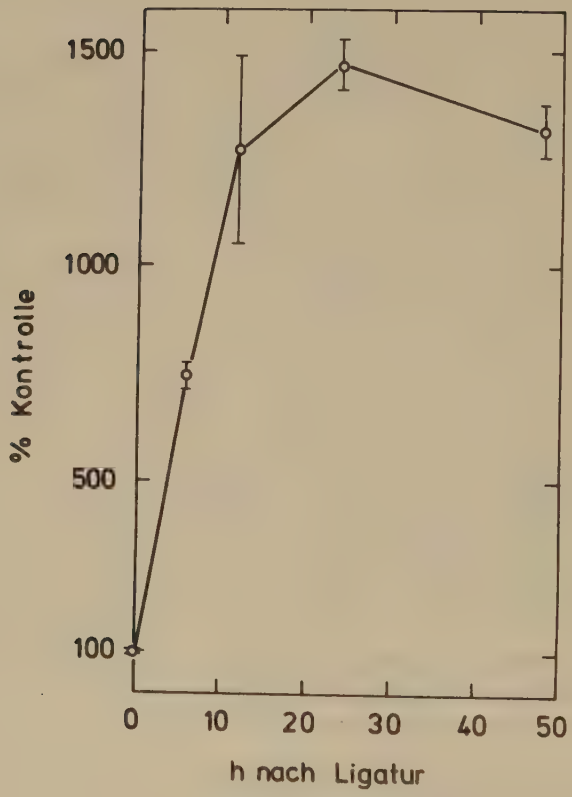


Fig. 17 NGF-Gehalt des Ischiasnervs nach Ligatur

Die Ligatur wurde in Wistarratten nach **3.14.** durchgeführt und der NGF-Gehalt nach verschiedenen Zeiten in dem distal an die Ligatur anschließenden 2 mm-Abschnitt gemessen, wie in **4.1.5.** und **4.1.7.** beschrieben. Die Daten sind Mittelwerte + SEM von Quadruplikaten und als % Kontrolle ausgedrückt (Kontrollwert s. Tab. 9).

In allen proximalen Segmenten war der NGF-Gehalt im Vergleich zum kontralateralen Kontrollwert stark abgesunken. Im Abschnitt unmittelbar proximal zur Ligatur variierte der NGF-Gehalt zwischen 30 und 70% der Kontrolle und in den

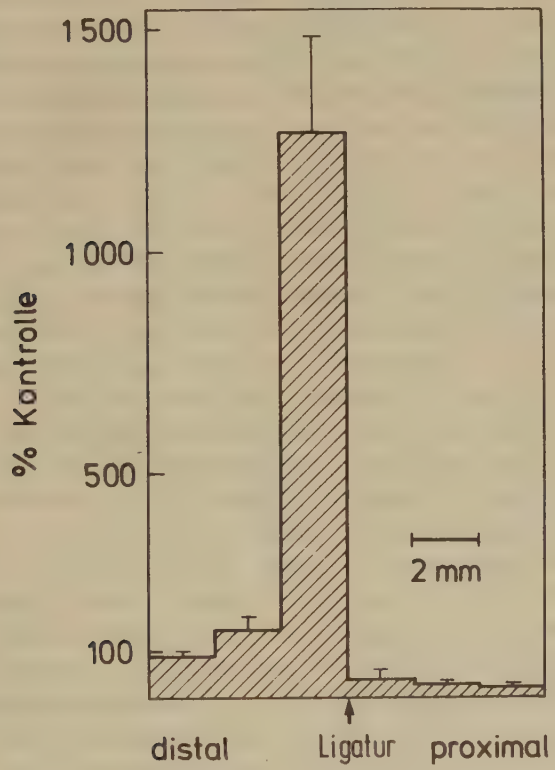


Fig. 18 NGF-Gehalt im Ischiasnerv 12 h nach einer Ligatur

Ligatur und NGF-Messung wie in Fig. 17 beschrieben Der NGF-Gehalt wurde in 6 mm-Abschnitten links und rechts angrenzend an die Ligatur bestimmt.

folgenden proximalen Segmenten erreichte oder unterschritt der NGF-Gehalt die Nachweisgrenze, die hier 20% des Kontrollwertes betrug (Fig. 18). Die durchgehend höheren Werte, die im unmittelbar der Ligatur benachbarten Segment im Vergleich zu den weiter proximal liegenden Abschnitten auftraten, sind wahrscheinlich auf Kontamination durch das distal an die Ligatur anschließende Segment zurückzuführen.

Der NGF-Gehalt in den Spinalganglien mit afferenten Fasern im Ischiasnerv (Segmente L3-L6) sank nur auf minimal 78% des kontralateralen Kontrollwertes. Dieses unerwartete Ergebnis liegt möglicherweise daran, daß diese Ganglien auch afferente Fasern in verschiedenen anderen sensorischen Nerven aufweisen. Zudem ist nicht klar, in welchem Ausmaß sympathische Neuronen am retrograden Transport von endogenem NGF im Ischiasnerv beteiligt sind. Außer den Axonen der Motoneuronen, die NGF nicht transportieren (Stöckel et al. 1975), und den sensorischen Axonen enthält der Ischiasnerv der Ratte auch eine beträchtliche Anzahl sympathischer Nervenfasern, wie durch Nachweis von Katecholaminen und Tyrosinhydroxylase gezeigt wurde (Dahlström 1971, Oesch et al. 1973). Allerdings kann auch eine Synthese von NGF durch nichtneuronale Zellen im Ganglion mit den hier aufgeführten Resultaten nicht ausgeschlossen werden.

Die Transportrate kann aus dem linearen Teil des Zeitverlaufs der NGF-Akkumulation unter der Annahme berechnet werden, daß die Transportgeschwindigkeit durch die Ligatur nicht beeinflußt wird. Die errechnete Geschwindigkeit von 2 mm/h liegt im Bereich der Transportgeschwindigkeiten, die für retrograden axonalen Transport von exogenem ^{125}I-NGF bestimmt wurden (vgl. Schwab und Thoenen 1983).

Die asymmetrische, zeitabhängige Akkumulation von NGF distal zu einer Ligatur, und das entsprechende Absinken des NGF-Gehalts proximal dazu, stellen einen direkten und quantitativen Nachweis für den retrograden axonalen Transport von endogenem NGF dar.

4.2.3. Blockade des retrograden axonalen Transports im sympathischen Nervensystem durch 6-OH-Dopamin

Aus den Ligaturexperimenten kann nicht abgeleitet werden, ob die sympathischen oder sensorischen Neuronen NGF ausschließlich aus der Peripherie beziehen, da die mechanische Unterbrechung des axonalen Transportes für ein Organ oder ein Ganglion kaum vollständig durchgeführt werden kann. Daher wurde die Droge 6-OH-Dopamin verwendet, um den Einfluß einer Transportblockade auf den NGF-Gehalt in sympathischen Ganglien und Zielorganen zu untersuchen (Mechanismus der 6-OH-Dopamin-Wirkung s. **3.16.**).

Wistarratten wurde intraperitoneal 100 mg 6-OH-Dopamin/kg Körpergewicht injiziert wie in **3.16.** beschrieben. Die Ratten wurden 3, 12, 24 und 49 h später dekapitiert. Iris, submandibulare Speicheldrüse, Herzvorhof und -ventrikel, SCG und Stellarganglion wurden entnommen und auf ihren NGF-Gehalt untersucht wie in **4.1.5.** und **4.1.7.** beschrieben. Als Kontrolle dienten Tiere gleichen Alters und Geschlechts, denen der entsprechende Puffer injiziert wurde und deren Organe in gleicher Reihenfolge entnommen wurden. Es erwies sich als notwendig, Kontrolle und 6-OH-Dopamin-behandelte Tiere im selben EIT zu messen, da andernfalls die Intertestvarianz zu groß für eine genauere Analyse der 6-OH-Dopamin-Wirkung war.

In den Zielorganen stieg der NGF-Gehalt in 12 h auf das 2-4 fache des Kontrollwertes (Fig. 19,20), wobei schon nach 3 h in Herzvorhof und Speicheldrüse ein signifikanter Anstieg zu beobachten war. In Herzvorhof und Speicheldrüse wurde zwischen 12 und 48 h kein weiterer Anstieg beobachtet, während der NGF-Gehalt in der Iris und im Herzventrikel zwischen 12 und 48 h noch weiter anstieg.

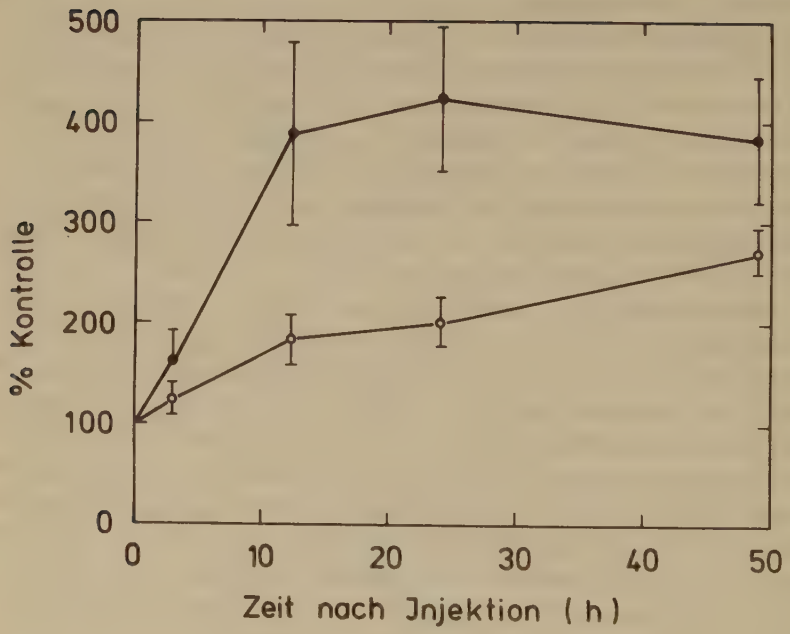


Fig. 19 NGF-Gehalt in Zielorganen des SCG nach 6-OH-Dopamin-Injektion

Die Behandlung mit 6-OH-Dopamin wurde nach **3.16.** durchgeführt und der NGF-Gehalt nach **4.1.5.** und **4.1.7.** bestimmt. Der NGF-Gehalt wird als % Kontrolle ausgedrückt und als Funktion der Zeit nach 6-OH-Dopamin-Gabe aufgetragen. Die Mittel der Kontrollwerte waren nicht signifikant von den in Tab. 9 aufgeführten Werten verschieden. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 2-4 unabhängigen Bestimmungen.

- ● Submandibulare Speicheldrüse
- o Iris

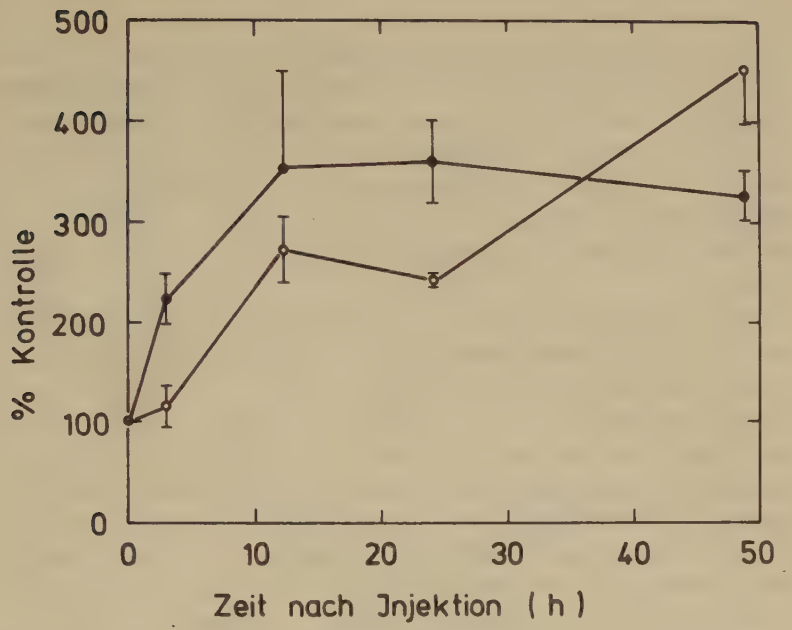


Fig. 20 NGF-Gehalt in Zielorganen des Stellarganglions nach 6-OH-Dopamin-Injektion

Die Legende zu Fig. 19 gilt entsprechend.
● Herzvorhof
o Herzventrikel

Diffusionsverluste und möglicherweise Abbau des angehäuften NGF führen bei gleichbleibender Syntheserate in den Zielorganen dazu, daß sich eine Gleichgewichtskonzentration einstellt, wie es für Herzvorhof und Speicheldrüse auch beobachtet wurde. Es ist denkbar, daß der abweichende Zeitverlauf in der Iris und im Herzventrikel eine Steigerung der Syntheserate reflektiert. Das würde bedeuten, daß die NGF-Synthese in den verschiedenen Organen nicht einheitlich reguliert wird.

Die anfänglich geringere NGF-Akkumulation in der Iris hat ihren Grund vermutlich in der dichten sensorischen Innervation der Iris. Da die sensorischen Neuronen durch 6-OH-Dopamin nicht beeinflußt werden, können sie NGF in vermehrtem Ausmaß abtransportieren. Kompetition der sensorischen und sympathischen Innervation der Iris um exogenen NGF wurde kürzlich von Kessler et al. (1983) gezeigt.

Parallel zum Anstieg in den Zielorganen fiel der NGF-Gehalt in den sympathischen Ganglien innerhalb 24 h auf 3-4% des Kontrollwertes ab (Fig. 21).

Da 6-OH-Dopamin den axonalen Transport selber nicht beeinflußt, und die sympathischen Axone mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 2 mm/h geleert werden, sollte der NGF Verlust in den Ganglien erst nach einer gewissen Verzögerungszeit beginnen. Jedoch wurde schon nach 3 h ein signifikanter Abfall des NGF-Gehalts auf 75% im oberen Zervikalganglion und 61% im Stellarganglion beobachtet. Vermutlich liegt dieser Befund an der Existenz sehr kurzer postganglionärer Nervenfasern zu benachbarten Organen im oberen Zervikalganglion und besonders im Stellarganglion, die schon frühzeitig keinen NGF mehr nachliefern können. Obwohl nicht auszuschließen, ist es unwahrscheinlich, daß es sich um einen akuten toxischen Effekt des 6-OH-Dopamin handelt, da der NGF-Gehalt in den Zielorganen nach 3 h bereits erhöht ist gegenüber Kontrollwerten.

Zwischen 24 und 49 h steigt der NGF-Gehalt der sympathischen Ganglien wieder auf 20-30% des Kontrollwertes. Das kann auf beginnende Regeneration der sympathischen Nervenendigungen oder auf Induktion der Synthese im Ganglion als möglicher Teil eines Reparaturmechanismus zurückzuführen sein. Um das zu entscheiden, wurden Ratten nach einer ersten Injektion mit 6-OH-Dopamin 2 Tage später nochmals injiziert und der NGF-Gehalt in den sympathischen Ganglien 24 h nach der 2.Injektion bestimmt. Die NGF-Konzentration blieb

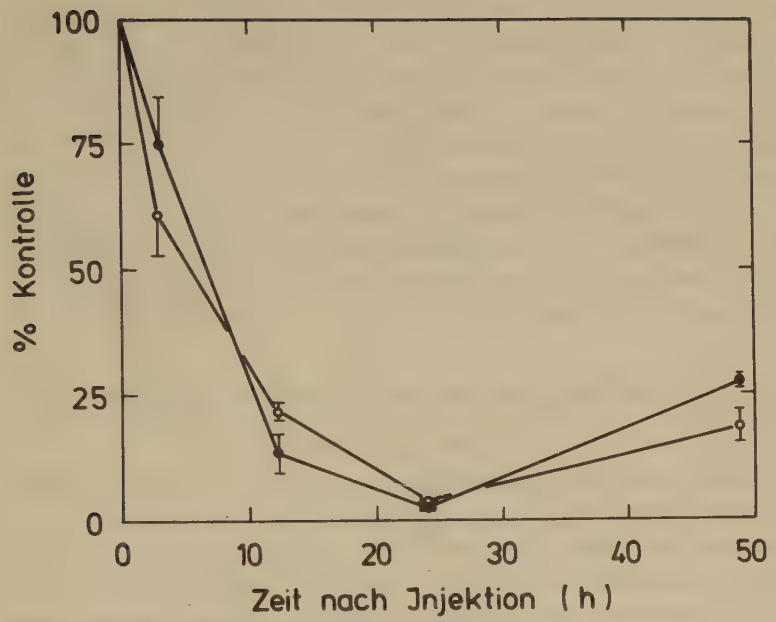


Fig. 21 NGF-Gehalt in sympathischen Ganglien nach 6-OH-Dopamin-Injektion

Die Legende zu Fig. 19 gilt entsprechend.
● SCG
o Stellarganglion

unverändert bei 20-30% des Kontrollwertes, was eine Induktion der Synthese in den Ganglien als Folge der Neuronenschädigung möglich erscheinen läßt.

Unter Vernachlässigung der Verzögerungsphase läßt sich aus dem Zeitverlauf des NGF-Gehalts in den sympathischen Ganglien zwischen 0 und 24 h eine Abschätzung der Halbwertszeit für den NGF-Abbau erhalten. Mit der Annahme einer monomolekularen Reaktion ergibt sich eine Halbwertszeit von 5 h (vgl. **3.9.** für die Berechnung).

Der Anstieg der NGF-Konzentration in den Zielorganen un die gleichzeitige Abnahme in den sympathischen Ganglien sprechen dafür, daß eine NGF-Synthese im intakten sympathischen Ganglion nicht stattfindet, sondern auf die innervierten Organe beschränkt ist.

4.2.4. Systemische Blockade des axonalen Transports mit Colchicin

Colchicin blockiert den axonalen Transport in sympathischen und sensorischen Neuronen (vgl. **3.17.**).

Adulten Wistarratten wurde Colchicin in den Dosen 1 und 10 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert, wie in **3.17.** beschrieben. Die Ratten wurden 12 h später dekapitiert und submandibulare Speicheldrüse, Herzvorhof, -ventrikel, Iris, SCG und Stellarganglion entnommen und auf ihren NGF-Gehalt untersucht, wie in **4.1.5.** und **4.1.7.** beschrieben. Längere Zeitabschnitte und höhere Dosen konnten wegen der hohen Mortalität der Versuchstiere nicht untersucht werden.

Bei der niedrigeren Dosis wurde keine signifikante Wirkung beobachtet, während bei 10 mg/kg der NGF-Gehalt in den Zielorganen auf maximal das dreifache des Kontrollwertes anstieg und in den Ganglien auf 30-40% der Kontrolle abnahm (Tab. 12).

Die Blockade des axonalen Transports führt also auch hier zur Anhäufung von NGF in den Zielorganen und Abnahme in den Ganglien. Dieses Ergebnis bestätigt die in **4.2.3.** gegebene Interpretation der Versuche mit 6-OH-Dopamin.

Sowohl Anhäufung in den Zielorganen (mit Ausnahme der Iris) als auch Abnahme in den sympathischen Ganglien sind

nach Colchicininjektion geringer als nach 6-OH-Dopamin Gabe. Der relativ hohe Anstieg in der Iris erklärt sich möglicherweise durch den Beitrag der dichten sensorischen Innervation der Iris zum retrograden Abtransport von NGF. Es konnte nicht festgestellt werden, ob der maximale Effekt auf den axonalen Transport bereits bei der verwendeten Colchicin-Dosis von 10 mg/kg erreicht wurde, da höhere Dosen nicht eingesetzt werden konnten. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, daß Colchicin die Proteinsynthese beeinträchtigt (vgl. Creasey et al. 1971).

Tab. 12 Einfluß von Colchicin auf den NGF-Gehalt **in vivo**

Organ	NGF-Gehalt (% Kontrolle) *	
Colchicin :	1 mg/kg	10 mg/kg
Iris	125 ± 28	304 ± 59
Submandibulare Speicheldrüse	89 ± 17	228 ± 23
Herzvorhof	95 ± 19	255 ± 41
Herzventrikel	102 ± 31	109 ± 27
Oberes Zervikalganglion	72 ± 9	34 ± 7
Stellarganglion	87 ± 12	42 ± 7

* Mittelwerte ± SEM von Quadruplikaten
Kontrollwerte s. Tab. 9

5. DISKUSSION

5.1. Entwicklung des Enzymimmuntests für NGF

Vergleich mit früheren Nachweismethoden

Die Verteilung von NGF im Organismus und die Orte der NGF-Synthese waren lange Zeit Gegenstand von Kontroversen, da inadequate Nachweismethoden verwendet wurden.

Biologische Nachweismethoden sind im Prinzip gut geeignet, NGF in verschiedenen Spezies zu messen, weil das aktive Zentrum des NGF-Moleküles sich während der Evolution fast oder gar nicht verändert hat, im Gegensatz zu den nicht für die biologische Aktivität benötigten Sequenzen. Das kann z.B. daraus entnommen werden, daß Maus-NGF die volle biologische Aktivität auf sensorische Neuronen aus Hühnern hat, obwohl immunologisch keine Kreuzreaktivität besteht (vgl. Thoenen und Barde 1980). Problematisch ist allerdings die mangelnde Spezifität der biologischen Nachweismethoden. Die biologischen Wirkungen von NGF wie vermehrtes Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen und Förderung des Neuritenwachstums werden auch von anderen Molekülen hervorgerufen, die nicht mit NGF identisch sind. Kürzlich wurde z.B. ein Protein aus Gehirn isoliert, das sowohl Überleben als auch Neuritenwachstum von sensorischen Neuronen fördert (Barde et al. 1982). Auch für sympathische Neuronen und Pheochromocytoma-Zellen (PC 12-Klon) sind entsprechende Faktoren bekannt (Edgar et al. 1981, Edgar et al. 1979). Daher muß die beobachtete biologische Wirkung durch Antikörper gegen NGF blockierbar sein, um als NGF-spezifisch gelten zu können. Damit unterliegen die biologischen Nachweismethoden denselben Beschränkungen durch mangelnde Kreuzreaktivität, die für die immunologischen Methoden gelten. In Experimenten, die ohne solche Antikörper-Kontrollen durchgeführt wurden, wurden fälschlich

große NGF-Mengen in Organen der Maus gefunden (Greene 1977).

Die zweite Gruppe von NGF-Nachweisen ist immunologischer Natur. Die meisten der falschpositiven NGF-Nachweise wurden mit kompetitiven Immuntests erhalten (Johnson et al. 1971, Furukawa et al. 1979, Furukawa und Hayashi 1980, Schwartz und Breakefield 1980, Walker et al. 1980, Walker et al. 1981, Bray et al. 1982). Dabei kompetitieren radioaktiv markierter NGF und der NGF aus der Probe um eine begrenzte Anzahl Bindungsstellen, die entweder Antikörper oder Rezeptoren (Radiorezeptortest) sind. Die Abnahme der gebundenen Radioaktivität wird hier als die Gegenwart von nichtmarkiertem NGF interpretiert, kann aber ebensogut auf die Gegenwart NGF-bindender Stoffe in der Probe zurückzuführen sein. Solche Stoffe wurden im Serum nachgewiesen (Suda et al. 1978) und einer davon wurde als α_2-Makroglobulin identifiziert (Ronne et al. 1979). Im Gegensatz zum zweiseitigen Immuntest (s.u.) und zu biologischen Nachweismethoden weist der kompetitive Immuntest also einen systematischen Fehler auf.

Der zweiseitige Immuntest vermeidet die Schwierigkeiten, die beim kompetitiven Test auftreten. Der NGF aus der Probe wird hier an einen Überschuß von Festphasen-Antikörper gebunden, und dann mit einem zweiten, markierten Antikörper quantifiziert. Im Gegensatz zum kompetitiven Immuntest ist hier aber die Reinheit der verwendeten Antikörper kritisch. Antikörper gegen kontaminierende Proteine führen im besten Fall zur Verschlechterung der Sensitivität und schlimmstenfalls zu falschpositiven Ergebnissen. Da mit üblichen Präparationsmethoden gewonnener NGF sehr immunogene Kontaminanten enthält, führt die Verwendung von nicht affinitätsgereinigten Antikörpern mit Sicherheit zu unzuverlässigen Ergebnissen. So wurden mit nicht affinitätsgereinigten Antikörpern auch mit dem zweiseitigen Radioimmuntest große NGF-Mengen in einer Vielzahl von Organen gefunden (Hendry 1972). Es wurde nachgewiesen, daß NGF-Präparationen häufig mit Mausimmunglobulinen kontami-

niert sind (Tomita und Varon 1971) und daß käufliche NGF-Antiseren große Mengen antiMaus-IgG-Antikörper enthalten (Carstairs et al.1977). Diese Antikörper können selbst durch Affinitätschromatographie nicht vollständig entfernt werden (vgl **4.1.6.**).

Mit den Nachweismethoden, die den erwähnten Spezifitätskriterien Rechnung tragen, wie Test der biologischen Aktivität mit angemessener Antikörperkontrolle und zweiseitiger Radioimmuntest mit gereinigten Antikörpern konnte keiner der oben angeführten positiven NGF-Nachweise reproduziert werden (Suda et al. 1978, Harper et al. 1980b, Skaper und Varon 1982). Wegen der mangelnden Sensitivität dieser Meßmethoden konnte der NGF-Gehalt nur in **in situ** denervierten oder in Kultur gebrachten Organen nachgewiesen werden, in denen er stark erhöht war (Harper et al 1980a, Ebendal et al. 1980). Die Ergebnisse bei denervierten Organen können aber nicht als repräsentativ für die **in vivo**-Situation gelten, da nicht klar ist, inwieweit die Spezifität der NGF-Synthese als Folge der Denervation verändert wurde.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten quantitativen Meßmethode wurde es erstmals möglich, den NGF-Gehalt **in vivo** in sympathisch innervierten Zielorganen und in sympathischen und sensorischen Ganglien zu messen. Es wurde eine Modifikation des zweiseitigen Immuntests benutzt, die ein Enzym als Marker für den 2. Antikörper verwendet (EIT). Der EIT ist 500x empfindlicher als der zweiseitige Radioimmuntest (Suda et al. 1978) und 20x empfindlicher als der nach Entwicklung meiner Methode veröffentlichte Enzymimmuntest von Furukawa et al. (1983).

Die Sensitivität des EIT hängt davon ab, daß ein möglichst großer Prozentsatz des zu messenden Antigens gebunden wird, daß pro gebundenem Antigen-Molekül ein möglichst großes Signal erzeugt wird, und daß gleichzeitig das Hintergrundsignal möglichst klein ist.

Um diese Forderungen möglichst gut zu erfüllen, wurden in vier verschiedenen Bereichen des EIT Änderungen vorgenommen:

Verwendete Antikörper

Um möglichst hochaffine Antikörper zu erhalten, wurden sowohl monoklonale Antikörper produziert als auch die Immunisation mit sehr kleinen Mengen Antigen durchgeführt. Die Affinität des verwendeten monoklonalen Antikörpers 27/21 war nur 1.6x höher als die der polyklonalen Schafantikörper, obwohl dieser Antikörper die kleinste Dissoziationskonstante von mehreren Klonen hatte, die bei der Fusion erhalten wurden (Harper,persönliche Mitteilung). Bei der Immunisation von Kaninchen mit 5 und 10 µg NGF wurde eine Antikörperpopulation erhalten, deren mittlere Affinität ebenfalls nicht wesentlich über der der polyklonalen Schafantikörper lag.

Aus der Analyse der Bindungsdaten der polyklonalen Kaninchen- und Schafantikörper nach Scatchard (1949) ergab sich kein Hinweis für eine mögliche kleine Antikörperpopulation mit wesentlich über dem Mittel liegenden Affinitäten. (Diese wäre durch einen konkaven Scatchard-Graph sichtbar geworden).

Die erreichten Dissoziationskonstanten lagen im Bereich von 0.2 bis 0.6 nM.

Bindung des ersten Antikörpers an die feste Phase

Mit der kovalenten Kopplung an Glas wurde eine Methode entwickelt, die ohne Aktivitätsverlust der Antikörper die irreversible Bindung an die feste Phase ermöglicht. Durch die kovalente Bindung konnten rigorose Waschbedingungen

verwendet werden, die zur Reduktion des Hintergrundsignals ohne gleichzeitiges Auswaschen von spezifischen Antikörper-NGF-Komplexen führten.

Marker für den zweiten Antikörper

Anstelle eines radioaktiven Jodatoms wurde ein Enzymmolekül als Marker für den zweiten Antikörper verwendet. Das hat den Vorteil einer Amplifikation des Signals und einer größeren Stabilität des modifizierten Antikörpers. Radioaktiv markierte Antikörper sind üblicherweise 1-2 Monate verwendbar, während die Enzymkonjugate in dieser Arbeit länger als ein Jahr benutzt werden konnten.

Die ß-Galaktosidase aus **E.coli** wurde ausgewählt, weil sie eine sehr hohe Aktivität (Umsatzzahl 6000 s^{-1} mit o-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid bei 25°C, Wallenfels und Weil 1972) mit geringer Empfindlichkeit gegen hohe Salzkonzentrationen und nichtionische Detergentien verbindet. ß-Galaktosidase zeigt weder Produkt- noch Substratinhibition unter den verwendeten Bedingungen (vgl. 3.5.) und besitzt ein Substrat, das ein intensiv fluoreszierendes Produkt liefert.

Da die SH-Gruppen der Galaktosidase nicht für ihre Aktivität benötigt werden und Immunglobuline keine freien SH-Gruppen besitzen, kann ein heterobifunktionales Kopplungsreagenz eingesetzt werden, das mit SH- und NH_2-Gruppen reagiert. Dadurch wird das Entstehen von Homopolymeren von Antikörper- oder Galaktosidasemolekülen verhindert, die im Enzymimmuntest inaktiv sind.

Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Konzentration der festen Antikörper wurde ungefähr so hoch wie die Dissoziationskonstante der Antikörper-NGF-Wechselwirkung eingestellt, so daß der Anteil der gebundenen

NGF-Moleküle am Ende der ersten Inkubation um 50% lag (s. Massenwirkungsgesetz). Das entsprach einer Glaskugel mit 1mm Durchmesser pro 50 µl Probevolumen. Die Konzentration der immobilisierten Antikörper könnte zwar auch so hoch gewählt werden, daß in der ersten Inkubationsphase praktisch aller NGF gebunden wird; dadurch stiege aber gleichzeitig das Hintergrundsignal stark an.

Die Reaktionszeit mit dem ersten Antikörper war ein Kompromiß zwischen Praktikabilität des Tests und Erreichen des Gleichgewichts. Dagegen wurde das Gleichgewicht bei der Inkubation mit dem zweiten, markierten Antikörper schon nach kurzer Zeit erreicht (1-3 h). Die Reaktionszeit wurde auf die mittlere Zeit (2 h) beschränkt und die Konzentration des 2. Antikörpers für diese Standardinkubationszeit optimiert. D.h., die Konzentration des zweiten Antikörpers wurde so hoch, wie es ohne Beeinträchtigung des Signal/Rausch-Verhältnisses möglich war, gewählt. Dadurch wird eine möglichst große Assoziationsgeschwindigkeit erreicht,

$$v_{ass.} = k_{+1} \cdot (Ak\text{--}NGF) \cdot (Ak\text{-}Gal)$$

und also ein möglichst hohes spezifisches Signal erhalten.

Das Hintergrundsignal wird größtenteils durch unspezifische Adsorption von Galaktosidase an die feste Phase verursacht; der Leerwert in der Enzymreaktion ist demgegenüber vernachlässigbar. Die unspezifischen Wechselwirkungen konnten durch ausgedehnte Waschperioden, die Verwendung von hohen Trägermolekülkonzentrationen, mittlerer Ionenstärke und nichtionischem Detergens reduziert werden. Die Natur des nichtionischen Detergens spielte keine wesentliche Rolle, während bei den Trägermolekülen der Einsatz von Serum zusätzlich zu Albumin und Gelatine noch zu einer wesentlichen Reduzierung führte.

Das kleine Testvolumen von 50 µl war eine wichtige Voraussetzung für eine NGF-Messung mit vertretbarem Aufwand in Organen wie der Iris (0.7 mg Feuchtgewicht/Iris).

Zuverlässigkeit des EIT

Die Spezifität und damit die Zuverlässigkeit des zweiseitigen EIT hängen wesentlich von der Reinheit der verwendeten Antikörper ab.

Aus Antiseren gewonnene polyklonale Antikörper erkennen eine Vielzahl antigener Determinanten auf dem Antigen. Dadurch wird ein falschpositives Signal im EIT durch zufälliges Vorkommen einer bestimmten Determinante auf nichtverwandten Molekülen extrem unwahrscheinlich. Andererseits können polyklonale Antikörper auch nach Affinitätsreinigung an dem entsprechenden Antigen nicht spezifischer sein als das Antigen rein ist.

Monoklonale Antikörper haben den Vorteil einer absoluten Spezifität für ein bestimmtes Epitop. Dieses Epitop kann aber sowohl auf anderen Molekülen vorhanden sein (falschpositive Ergebnisse), als auch modifiziert oder abwesend auf dem selben Antigen in einer anderen Spezies sein (falschnegative Ergebnisse).

Daher wurde der EIT sowohl mit monoklonalen als auch mit polyklonalen affinitätsgereinigten Antikörpern durchgeführt. Da die Ergebnisse beider Meßmethoden nicht signifikant verschieden sind, reflektieren die gemessenen Werte die tatsächlichen NGF-Konzentrationen offenbar recht genau.

Eine zusätzliche Bestätigung dafür wurde durch Messung der biologischen Aktivität von NGF im SCG der Ratte erhalten, die eine qualitative Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immunologischen NGF-Messung ergab.

Vergleich mit Enzymimmuntests anderer Autoren

Zur Frage der Optimierung von Enzymimmuntests existiert mittlerweile eine umfangreiche Literatur. Wichtige Übersichtsartikel stammen von Schuurs und Van Weemen (1977), Avrameas et al. (1978), Ishikawa und Kato (1978), O'Sullivan et al. (1979a) und Herrmann (1981). Im allgemeinen

existieren jedoch gegensätzliche Aussagen zur Lage des Optimums im Immuntest.
Bei der Adsorption von Antikörper an Polystyrol sind die Ergebnisse von Cantarero et al. (1980) und Salonen und Vaheri (1979) mit meinen Resultaten konsistent, was die maximale Belegungsdichte mit Antikörpern und die für den EIT optimale Konzentration in der Beschichtungslösung betrifft, während Furukawa et al. (1983) widersprechende Resultate erzielt haben. Cantarero et al. (1980) beobachteten keinen signifikanten Verlust des adsorbierten Antikörpers während der Durchführung des EIT, im Gegensatz zu meinen Resultaten und denen von Salonen und Vaheri (1979). Manche Autoren (Hendry und Herrmann 1980) finden in einem weiten Bereich keine Abhängigkeit der Sensitivität von dem Verhältnis reaktive Oberfläche zu Reaktionsvolumen, was in Gegensatz zu meinen Ergebnissen steht. Die kovalente Kopplung des ersten Antikörpers an Polystyrol führte bei Neurath und Strick (1981) zu stark erhöhter Empfindlichkeit des EIT, was von mir nicht bestätigt werden konnte, ebensowenig wie eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses durch Verwendung von Fab-Fragmenten im EIT zu beobachten war (Gegensatz zu Ishikawa und Kato 1978, Übereinstimmung mit Neurath und Strick 1981). Der Zusatz von Serum wird oft als störend für den EIT beschrieben (vgl. Ishikawa und Kato 1978), während bei meiner Versuchsanordnung eine ausgeprägte Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses zu beobachten war (qualitative Übereinstimmung mit Furukawa et al. 1983).

Der Grund für diese mangelnde Übereinstimmung liegt wahrscheinlich in der Komplexität des Optimierungsproblems. Aufgrund der Vielzahl der Parameter muß das Optimierungsproblem in einem hochdimensionalen Parameterraum gelöst werden. Unter diesen Bedingungen gibt es im allgemeinen viele lokale Optima, die bei sehr verschiedenen Parametersätzen liegen können. Da zudem die genauen Reaktionsbedingungen meist nicht übertragbar sind, muß offenbar das Optimierungsproblem für jede neue Fragestellung experimentell gelöst werden.

5.2. Vorkommen, Synthese und Transport von NGF

Vorkommen

NGF wurde in allen getesteten sympathisch innervierten Organen, in 10-50fach höhererer Menge in sympathischen Ganglien, und auch in sensorischen Ganglien nachgewiesen. Die gemessenen Werte sind 1-4 Größenordnungen kleiner als die mit irreführenden Nachweismethoden erhaltenen Werte (vgl.5.1.). Der extrem niedrige NGF-Gehalt in den innervierten Organen ist wahrscheinlich das Ergebnis eines Fließgleichgewichts zwischen Produktion von NGF und retrogradem Abtransport durch die innervierenden Neuronen.

Die an den Nervenendigungen wirksamen NGF-Konzentrationen können aus dem gemessenen NGF-Gehalt nicht berechnet werden, da die Verteilung von NGF im Gewebe sicher nicht homogen ist. Sehr wahrscheinlich wird der synthetisierte NGF in den Extrazellulärraum sekretiert, wie es auch von Organkulturexperimenten nahegelegt wird (Ebendal et al. 1980). Die für die Nervenendigungen relevante NGF-Konzentration im Extrazellulärraum könnte also viel höher als der für das ganze Gewebe berechnete Durchschnittswert sein.

Die NGF-Konzentrationen im Blut der Ratte (<0.05 ng/ml) und der Maus (0.04 und 0.10 ng/ml, geschlechtsabhängig) können dagegen gemessen werden. Sie sind einige Größenordnungen kleiner als die Konzentrationen, die für das Überleben und die spezifische Enzyminduktion sympathischer Neuronen **in vitro** notwendig sind (Chun und Patterson 1977, Hefti et al. 1983). Da es auch keine Anhaltspunkte für ein hochaffines und spezifisches Aufnahmesystem für NGF in den innervierten Organen gibt, das NGF aus dem Blut aufnehmen und an die Neuronen weiterleiten könnte, kann die Versorgung der sympathischen und sensorischen Neuronen mit NGF über die Blutbahn ausgeschlossen werden. Damit handelt es sich bei NGF nicht um ein Hormon im eigentlichen Sinne. Die meßbaren

NGF-Konzentrationen im Mäuseblut sind zudem höchstwahrscheinlich auf fehlerhafte NGF-Sekretion in der Speicheldrüse zurückzuführen, wie durch die Geschlechtsspezifität des NGF-Gehalts in Speicheldrüse und Blut im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Geweben nahegelegt wird. Vermutlich gelangt ein winziger Bruchteil des in der Speicheldrüse synthetisierten NGF nicht über den typischen Sekretionsweg zur apikalen Zellmembran, und damit in die speichelführenden Gänge, sondern erreicht durch Exocytose an der basalen Zellmembran den Blutkreislauf. Eine entsprechende Beobachtung wurde bei Säugetieren gemacht, deren Prostata große NGF-Mengen enthält (Harper und Thoenen 1980).

Mit Ausnahme der Epiphyse ist der NGF-Gehalt in den Zielorganen mit der sympathischen Innervationsdichte korreliert; das gilt auch für Zielorgane der 'kurzen' adrenergen Neuronen. Diese Korrelation kann auf eine Steuerung der Innervationsdichte durch die NGF-Produktion in den Endorganen zurückzuführen sein. Diese Interpretation wird gestützt durch die Vermehrung sympathischer Nervenfasern **in vivo** nach lokaler NGF-Injektion (Levi-Montalcini 1976) und die Beobachtung von Campenot (1982), daß die Dichte der Neuritenproduktion **in vitro** durch die zugesetzte NGF-Menge reguliert wird (bei Konzentrationen, die die für maximales Überleben sympathischer Neuronen erforderliche NGF-Konzentration übersteigen).

Der 1 - 2 Größenordnungen höhere NGF-Gehalt in den sympathischen Ganglien im Vergleich zu den innervierten Organen paßt zu der vermuteten Konzentrierung durch retrograden Transport in die Ganglien.

Die sensorische Innervationsdichte ist weit weniger genau bekannt als die sympathische. Trotzdem kann festgestellt werden, daß keine offensichtliche Korrelation mit dem NGF-Gehalt in den Zielorganen besteht, z.B. enthält der fast nicht sympathisch, aber sensorisch innervierte Skelettmuskel keinen nachweisbaren NGF. Das könnte darauf hinweisen, daß

nur ein kleiner Anteil des in den Endorganen synthetisierten NGF durch das sensorische Nervensystem aufgenommen und abtransportiert wird. Diese Interpretation wird gestützt durch die Beobachtung, daß die sensorischen Spinalganglien etwa 10mal weniger NGF als die sympathischen Ganglien enthalten. Der besonders niedrige NGF-Gehalt im Trigeminalganglion hat seine Ursache wahrscheinlich darin, daß die Zellkörperdichte in diesem Ganglion besonders gering ist, und daß ein großer Teil der durchlaufenden Fasern motorisch ist und also keinen NGF enthalten sollte (vgl. Stöckel et al. 1975).

Die ins Zentralnervensystem führenden Nervenfasern der Spinalganglien enthalten weniger als 2% des NGF-Gehalts der Ganglien. Das spricht dafür, daß die Neuronen in den Spinalganglien nicht über die zentralen Verbindungen, sondern über die peripheren Axonfortsätze mit NGF versorgt werden.

Transport und Synthese von NGF

Die bisherigen Messungen in unbehandelten Tieren konnten direkte Informationen nur über die stationäre NGF-Verteilung liefern. Daraus alleine kann noch keine Aussage über den Ort der NGF-Synthese im Organismus abgeleitet werden. Um über Synthese und Transport von endogenem NGF Aufschluß zu erhalten, wurde der axonale Transport sowohl in einem einzelnen Nerven als auch im ganzen sympathischen und sensorischen Nervensystem blockiert.

Die Unterbrechung des axonalen Transports im Ischiasnerv führte zur stark asymmetrischen Verteilung von NGF auf beiden Seiten der Ligatur. NGF wurde distal zur Ligatur bis zum 15fachen des Kontrollwertes angehäuft und sank auf der proximalen Seite bis zur, bzw. unter die Nachweisgrenze. Diese Resultate sind ein direkter Nachweis für den retrograden axonalen Transport von endogenem NGF. Im

Gegensatz dazu fand Riopelle et al. (1981) bei einer Ligatur des Ischiasnerv zwar einen Abfall auf 50% des Kontrollwertes auf der proximalen Seite, aber keine NGF-Anreicherung distal zur Ligatur. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf die mangelnde Eignung der verwendeten biologischen Nachweismethode zurückzuführen. Der Ischiasnerv enthält neben NGF auch andere neurotrophe Faktoren, so daß durch Antikörper gegen NGF nur 25-30% des biologischen Effekts blockierbar waren. Dadurch ist der Unsicherheitsfaktor bei der Differenzmessung zu groß, als daß verläßliche Aussagen möglich wären. Da in den Experimenten von Riopelle et al. (1981) keine Proteaseinhibitoren verwendet wurden, kann auch eine teilweise Proteolyse von akkumuliertem NGF nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl der Ischiasnerv - wie viele andere Gewebe (Harper et al. 1980a) - in Organkultur NGF synthetisieren kann (Richardson und Ebendal 1982), leistet eine denkbare Produktion von NGF durch Schwannzellen oder andere nichtneuronale Zellen im Nerv offenbar keinen signifikanten Beitrag zum NGF-Gehalt sowohl des operierten als auch des unbehandelten Nervs. Eine lokale, durch die Ligatur induzierte Synthese würde, im Gegensatz zur beobachteten Verteilung, zu einer symmetrischen Akkumulation von NGF auf beiden Seiten der Ligatur führen. Selbst bei Überlagerung durch retrograden axonalen Transport würde sich noch eine, wenngleich asymmetrische Akkumulation von NGF auf beiden Seiten der Ligatur ergeben. Da der NGF-Gehalt proximal zur Ligatur bis zur Nachweisgrenze absinkt, ist auch eine Aufrechterhaltung des normalen NGF-Spiegels durch lokale Produktion ausgeschlossen.

Der Effekt einer Blockade des retrograden axonalen Transports im gesamten sympathischen Nervensystem wurde mit 6-OH-Dopamin untersucht. Die 2-4fache Akkumulation von NGF in den sympathisch innervierten Organen (Iris, Speicheldrüse, Herzvorhof und Herzventrikel) nach einem Tag und das

gleichzeitige Absinken auf wenige Prozent des Kontrollwertes in den sympathischen Ganglien legen nahe, daß NGF ausschließlich in den Endorganen produziert wird.

Mit Colchicin, das über einen ganz anderen Mechanismus als 6-OH-Dopamin den axonalen Transport im gesamten peripheren Nervensystem blockiert, wurde ebenfalls ein NGF-Anstieg in den Zielorganen und ein Abfall in den sympathischen Ganglien beobachtet. Diese Ergebnisse sind eine unabhängige Bestätigung der Deutung, die für die 6-OH-Dopamin-Versuche gegeben wurde.

Es steht nicht fest, ob der Anstieg der NGF-Konzentration in den Zielorganen nach 6-OH-Dopamin-Gabe nur auf Akkumulation infolge fehlenden Abtransports zurückzuführen ist, oder ob zusätzlich die NGF-Synthese als Folge der Denervierung induziert wird. Für letzteres würde sprechen, daß in Herzventrikel und Iris nach zwei Tagen noch kein Gleichgewicht erreicht wurde, was im Falle einer unveränderten Syntheserate nach dieser Zeit wohl schon erreicht sein sollte. In beiden Fällen sprechen die Ergebnisse für eine Synthese von NGF in den Zielorganen des sympathischen Nervensystems.

Die hauptsächlich vorkommenden Zelltypen in den innervierten Organen sind glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Schwannsche Zellen. Bisher ist nicht bekannt, welche Zellart in den Endorganen NGF synthetisieren kann. Die NGF-Produktion in verschiedenen Tumorzellinien (vgl. Thoenen und Barde 1980) kann sicher nicht zur Beantwortung dieser Frage herangezogen werden, da bei Tumorzellen die Spezifität der Genexpression nicht vollständig erhalten bleibt. In einigen Fällen wurde auch die Synthese von NGF in Primärkulturen von dissoziierten Zellen berichtet (vgl. Thoenen und Barde 1980). Die Gefahr einer Derepression der genetischen Information besteht aber auch hier, da die dissoziierten Zellen sowohl ihre Wechselwirkungen im Organverbund verloren haben, als auch durch die Organentnahme denerviert worden

sind.

Der Wiederanstieg des NGF-Gehalts in den Ganglien zwei und drei Tage nach der ersten 6-OH-Dopamin-Injektion kann auf eine Neuinduktion der NGF-Synthese in den Ganglien zurückzuführen sein. Diese wäre dann als Teil eines Regenerationsmechanismus zu interpretieren und würde in Schwann-Zellen oder Fibroblasten stattfinden. Die Synthese in nichtneuronalen Zellen der Ganglien kann aber offenbar keine ausreichenden NGF-Mengen zur Verfügung stellen, da die durch 6-OH-Dopamin hervorgerufene Unterbrechung des retrograden axonalen Transports von NGF in neugeborenen Tieren nicht durch lokale NGF-Synthese in den sympathischen Ganglien, wohl aber durch NGF-Injektion kompensiert werden kann (Levi-Montalcini et al. 1975).

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten EIT konnten Vorkommen, Synthese und Transport von endogenem NGF gemessen werden, die bisher einer direkten experimentellen Untersuchung nicht zugänglich waren.
Die Ergebnisse (lokale Synthese in den Zielorganen, Korrelation mit der Innervationsdichte und retrograder axonaler Transport von endogenem NGF zu den neuronalen Zellkörpern) zeigen, daß NGF die Anforderungen erfüllt, die an einen Faktor gestellt werden müssen, der einen dirigierenden Einfluß der Endorgane auf die innervierenden Neuronen vermitteln soll (vgl. Fig. 22).

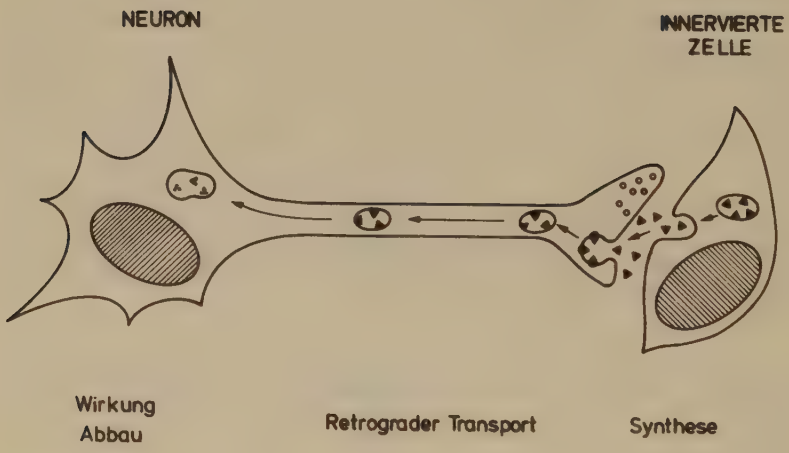


Fig. 22 Modellvorstellung für Synthese und Wirkung von NGF

NGF wird synthetisiert in Zellen, die vom sympathischen und sensorischen Nervensystem innerviert werden. Nach Exocytose wird NGF an spezifische Rezeptoren der Nervenzellmembran gebunden. Der Rezeptor-NGF-Komplex wird endocytotisch aufgenommen und die entstandenen Vesikel werden retrograd zum neuronalen Zellkörper transportiert, wo NGF seine Wirkung ausübt und schließlich in lysosomalen Strukturen abgebaut wird.

▲ NGF

Mit der vorliegenden Arbeit ist die Grundlage für einen weiten Bereich von Untersuchungen gegeben.

Es wird sehr interessant sein, das Auftreten von NGF während der Embryonalentwicklung mit dem Zeitpunkt der Innervierung der Organe zu vergleichen. In Organkulturen, z.B. von Ratteniris, kann die Regulation von Synthese und Freisetzung von NGF in den Endorganen auf der Translations- und Transkriptionsebene untersucht werden. Im gleichen System kann durch selektive Zerstörung der einzelnen, in der Iris vorkommenden Zellarten möglicherweise entschieden werden, welcher Zelltyp **in vivo** für die NGF-Produktion verantwortlich ist. Wichtige Hinweise für eine mögliche Funktion von NGF im Zentralnervensystem können durch Untersuchung von Vorkommen und axonalem Transport von NGF im Zentralnervensystem erhalten werden.

Die Resultate dieser Untersuchungen werden vielleicht einige der vielfältigen Probleme beim Verständnis der Differenzierung des Nervensystems lösen können.

LITERATURVERZEICHNIS

Almon, R.R., Varon, S. (1978) Associations of beta nerve growth factor with bovine serum albumin as well as with the alpha and gamma subunits of the 7S macromolecule. **J. Neurochem.** 30, 1559-1567.

Avrameas, S., Ternynck, T., Guesdon, J.-L. (1978) Coupling of enzymes to antibodies and antigens. **Scand. J. Immunol.** 8, Suppl. 7, 7-23.

Barde, Y-A., Edgar, D. & Thoenen, H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **EMBO J.** 1, 549-553.

Bocchini, V. & Angeletti, P.U. (1969) The nerve growth factor: Purification as a 30,000-molecular-weight protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 64, 787-794.

Bray, G.A., Shimomura, Y, Ohtake, M., & Walker, P. (1982) Salivary gland weight and nerve growth factor in the genetically obese (ob/ob) mouse. **Endocrinology** 110, 47-50.

Cantarero, L.A., Butler, J.E. & Osborne, J.W. (1980) The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their signifcance in solid-phase immunoassays. **Analyt. Biochem.** 105, 375-382.

Campenot, R.B. (1982) Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. I. Local control of neurite growth by nerve growth factor. **Dev. Biol.** 93, 1-12.

Carstairs, J.R., Edwards, D.C., Pearce, F.L., Vernon, C.A. & Walter, S.J. (1977) Immunogenic contaminants in mouse nerve-growth factor. **Eur.J.Biochem.** 77, 311-317.

Cathou, R.E. (1978) Solution conformation and segmental flexibility of immunoglobulins. In: **Comprehensive Immunology.** (Litman, G.W. & Good, R.A., eds.) Vol. 5, pp. 37-83 Plenum Press, New York.

Chun, L.L.Y. & Patterson, P.H. (1977) Role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons in vitro: I. Survival, growth and differentiation of catecholamine production. **J. Cell Biol.** 75, 694-704.

Cohen, S. (1960) Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 46, 302-311.

Cohen,S.& Levi-Montalcini, R. (1956) A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 42, 571-574.

Creasey, W.A., Bensch, K.G. & Malawista, S.E. (1971) Colchicine, vinblastine and griseofulvin. Pharmacological

studies with human leukocytes. **Biochem. Pharmacol.** 20, 1579-1588.

Dahlström, A. (1971) Axoplasmic transport (with particular respect to adrenergic neurons). **Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B** 261, 325-358.

Ebendal, T. Olson, L., Seiger, Å. & Hedlund, K.-O. (1980) Nerve growth factors in the rat iris. **Nature** 286, 25-28.

Edgar, D., Barde, Y.-A. & Thoenen, H. (1979) Induction of fibre outgrowth and choline acetyltransferase in PC12 pheochromocytoma cells by conditioned media from glial cells and organ extracts. **Exp. Cell Res.** 121, 353-361.

Edgar, D., Barde, Y.-A. & Thoenen, H. (1981) Subpopulations of cultured chick sympathetic neurones differ in their requirements for survival factors. **Nature** 289, 294-295.

Edsall, J.T. (1953) The size, shape and hydration of protein molecules. In: **The proteins, chemistry, biological activity and methods**, (Neurath, H. & Bailey, K., eds.), Vol. 1, pp. 549-726, Academic Press, New York.

Eisen, H.N. & Siskind, G.W. (1964) Variations in affinities of antibodies during the immune response. **Biochemistry** 3, 996-1008.

Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.** 82, 70-77.

Ey, P.L., Prowse, S.J. & Jenkin, C.R. (1978) Isolation of pure IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. **Immunochem.** 15, 429-436.

Fabricant, R.N., DeLarco,J.E. & Todaro, G.J. (1977) Nerve growth factor receptors on human melanoma cells in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74, 565-569.

Fahey, J.L. (1967) Purification of Antibody. B: Preparation of specific antibody, in: **Methods in Immunology and Immunochemistry** (Williams, C.A. & Chase, M.W., eds.) Vol. 1, pp. 307-339, Academic Press, New York.

Fenton, E.L. (1970) Tissue culture assay of nerve growth factor and of the specific antiserum. **Exp. Cell Res.** 59, 383-392.

Furukawa, S. & Hayashi, K. (1980) Molecular feature of the nerve growth factor in human serum. **Life Sci.** 26, 837-844.

Furukawa, S., Hayashi, K., Ohi, T. & Imura, H. (1979) Level of nerve growth factor-like immunoreactivity in the lower limb muscles of muscular dystrophic mice. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 90, 130-134.

Furukawa, S., Kamo, I., Furukawa, Y., Akazawa, S., Satoyoshi, E., Itoh, K. & Hayashi, K. (1983) A highly sensitive enzyme immunoassay for mouse ß-nerve growth factor. **J. Neurochem.** 40, 734-744.

Goedert, M., Otten, U. & Thoenen, H. (1978) Biochemical effects of nerve growth factor and its antibody on the vas deferens and the adrenal medulla. **Neurosci. Lett.** 8, 71-76.

Goudswaard, J., Van der Donk, J.a., Noordzij, A., Van Dam, R.H. & Vaerman, J.-P. (1978) Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. **Scand. J. Immunol.** 8, 21-28.

Greene, L.A. (1977) A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a clonal pheochromocytoma cell line. **Brain Res.** 133, 350-353.

Hamburger, V. (1977) The developmental history of the motor neuron. **Neurosci. Res. Program Bull.** 15 (Suppl.), 1-37.

Harper, G.P. & Thoenen, H. (1980) Nerve growth factor: Biological significance, measurement, and distribution. **J. Neurochem.** 34, 5-16.

Harper, G.P. & Thoenen, H. (1981) Target cells, biological effects, and mechanism of action of nerve growth factor and its antibodies. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 21, 205-229.

Harper, G.P., Al-saffar, A.M., Pearce, F.L. & Vernon,C.A. (1980a) The production of nerve growth factor in vitro by tissues of the mouse, rat, and embryonic chick. **Dev. Biol.** 77, 379-390.

Harper, G.P., Pearce, F.L., & Vernon, C.A. (1980b) The production and storage of nerve growth factor in vivo by tissues of the mouse, rat, guinea pig, hamster, and gerbil. **Dev. Biol.** 77, 391-402.

Harper, G.P., Glanville, R.W. & Thoenen, H., (1982) The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma: biochemical characterization and partial amino-acid sequence. **J. Biol. Chem.** 257, 8541-8548.

Hefti, F., Gnahn, H., Schwab, M.E. & Thoenen, H. (1982) Induction of tyrosine hydroxylase by nerve growth factor and by elevated K^+ concentrations in cultures of dissociated sympathetic neurons.**J. Neurosci.** 2, 1554-1566.

Hendry, I.A. (1972) Developmental changes in tissue and plasma concentrations of the biologically active spezies of nerve growth factor in the mouse, by using a two-site radioimmunoassay. **Biochem. J.** 128, 1265-1272.

Hendry, R.M. & Herrmann, J.E. (1980) Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay. **J. Immunol. Meth.** 35, 285-296.

Herrmann, J.E. (1981) Quantitation of antibodies immobilized on plastics. **Methods in Enzymology** 73, 239-244.

Holzbauer, M.& Sharman, D.F. (1972) The distribution of catecholamines in vertebrates. In **Handbook of Experimental Pharmacology**, (Blaschke, H. & Muscholl, E., eds.), Vol. 33, pp. 110-185, Springer, Berlin.

Ishikawa, E. & Kato, K. (1978) Ultrasensitive enzyme immunoassay. **Scand. J. Immunol.** 8, Suppl. 7, 43-55.

Johnson, D.G., Gorden, P. & Kopin, I.J. (1971) A sensitive radioimmunoassay for 7S nerve growth factor antigens in serum and tissues. **J. Neurochem.** 18, 2355-2362.

Jonsson, S. & Kronvall, G. (1974) The use of protein A-containing Staphylococcus aureus as a solid phase anti-IgG reagent in radioimmunoassays as exemplified in the quantitation of α-fetoprotein in normal human adult serum. **Eur. J. Immunol.** 4, 29-33.

Kappers, J.A. (1960) The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. **Z. Zellforsch.** 52, 163-215.

Kato, K., Umeda, U., Suzuki, F., Hayashi, D. & Kosaka, A. (1979) Use of antibody Fab' fragments to remove interference by rheumatoid factors with the enzyme-linked sandwich immunoassay. **FEBS Lett.** 102, 253-256.

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. **J. Immunol.** 123, 1548-1550.

Kessler, J.A., Bell, W.O. & Black, I.B. (1983) Interactions between the sympathetic and sensory innervation of the iris. **J. Neurosci.** 3, 1301-1307.

Koehler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 256, 495-497.

Leaback, D.H. & Walker, P.G. (1961) Studies on Glucosaminidase. 4. The fluorimetric assay of N-acetyl-ß-Glucosaminidase. **Biochem. J.** 78, 151-156.

Levi-Montalcini, R. (1976) The nerve growth factor: its role in growth differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. **Prog. Brain Res.** 45, 235-258.

Levi-Montalcini, R., Aloe, L., Mugnaini, E., Oesch, F. & Thoenen, H. (1975) Nerve growth factor induces volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 595-599.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-272.

Lubińska, L. (1975) On axoplasmic flow. **Int. Rev. Neurobiol.** 17, 241-296.

Mage, M.G. (1980) Preparation of Fab fragments from IgGs of different animal species. **Methods in Enzymology** 70, 142-150.

Marchalonis, J.J. (1969) An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. **Biochem. J.** 113, 299-305.

Marler, E., Nelson, C.A. & Tanford, C. (1964) The polypeptide chains of rabbit γ-globulin and its papain--cleaved fragments. **Biochemistry** 3, 279-284.

Mead, J.A.R., Smith, J.N. & Williams, R.T. (1955) Studies in Detoxication. 67. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of ß-glucuronidase. **Biochem. J.** 61, 569-574.

Miyake, J., Fehrnström, H. & Wallenborg, B. (1977) Agarose Gel Electrophoresis with LKB 2117 Multiphor. Application Note 310 (LKB ed.), pp. 1-5.

Neurath, A.R. & Strick, N. (1981) Enzyme-linked fluorescence immunoassays using ß-galactosidase and antibodies covalently bound to polystyrene plates. **J. Virol. Meth.** 3, 155-165.

Noelken, M.E., Nelson, C.A., Buckley, C.E. & Tanford, C. (1965) Gross conformation of rabbit 7S γ-Immunoglobulin and its papain-cleaved fragments. **J. Biol. Chem.** 240, 218-224.

Oesch, F., Otten, U. & Thoenen, H. (1973) Relationship between the rate of axoplasmic transport and subcellular distribution of enzymes involved in the synthesis of norepinephrine. **J. Neurochem.** 20, 1691-1706.

O'Sullivan, M.J., Bridges, J.W. & Marks, V. (1979a) Enzyme immunoassay: a review. **Ann. Clin. Biochem.** 16, 221-240.

O'Sullivan, M.J., Gnemmi, E., Morris, D, Chieregatti, G., Simmonds, A.D., Simmons, M., Bridges, J.W. & Marks, V. (1979b) Comparison of two methods of preparing enzyme-antibody conjugates: Application of these conjugates for enzyme immunoassay. **Analyt. Biochem.** 100, 100-108.

Otten, U., Lorez, H.P. & Businger, F. (1983) Nerve growth factor antagonizes the neurotoxic action of capsaicin on primary sensory neurones. **Nature** 301, 515-517.

Ouchterlony, Ö. & Nilsson, L.R. (1973) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In **Handbook of Experimental Immunology** (Weir, D.M., ed.), pp. 19.1-19.39, Blackwell Scientific Publ., Oxford.

Pearce, F.L., Banthorpe, D.V., Cook, J.M. & Vernon, C.A. (1973) Adsorption of nerve growth factor onto surfaces. **Eur. J. Biochem.** 32, 569-575.

Phelps, R.A., Putnam, F.W. (1960) Chemical composition and molecular parameters of purified plasma proteins. In **The Plasma Proteins** (F.W.Putnam, ed.) Vol. 1, pp. 143-178, Academic Press, New York.

Richardson, P.M. & Ebendal, T. (1982) Nerve growth activities in rat peripheral nerve. **Brain Res.** 246, 57-64.

Riopelle, R.J., Boegman, R.J. & Cameron, D.A. (1981) Peripheral nerve contains heterogenous growth factors that support sensory neurons in vitro. **Neurosci. Lett.** 25, 311-316.

Rohrer, H. & Barde, Y.-A. (1982) Presence and disappearance of nerve growth factor receptors on sensory neurons in culture. **Dev. Biol.** 89, 309-315.

Ronne, H., Anundi, H., Rask, L. & Peterson, P.A. (1979) Nerve growth factor binds to serum alpha-2-macroglobulin. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 87, 330-336.

Sabesan, M.N. (1980) Secondary structural and "active site" homologies between nerve growth factor and insulin. **J. Theor. Biol.** 83, 469-476.

Salonen, E.M. & Vaheri, A. (1979) Immobilization of viral and mycoplasma antigens and of imunoglobulins on polystyrene surface for immunoassays. **J. Immunol. Meth.** 30, 209-218.

Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 51, 660-672.

Schuurs, A.H.W.M., van Weemen, B.K. (1977) Enzyme-immunoassay. **Clin. Chim. Acta** 81, 1-40.

Schwab, M.E. & Thoenen, H. (1983) Retrograde axonal transport. In **Handbook of Neurochemistry** (A. Lajtha, ed.) 2nd edn., Vol. 5, pp. 381-404 Plenum Press, New York.

Schwartz, J.P. & Breakefield, X.O. (1980) Altered nerve growth factor in fibroblasts from patients with familial dysautonomia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77, 1154-1158.

Sjöstrand, N.O. (1965) The adrenergic innervation of the vas deferens and the accessory male genital glands. **Acta Physiol. Scand.** 65, Suppl. 257, 1-82.

Skaper, S.D. & Varon, S. (1982) Three independent biological assays for nerve growth factor: No measurable activity in human sera. **Exp. Neurol.** 76, 655-65.

Stähli, C. Staehelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J. & Häring, P. (1980) High frequencies of antigen-specific hybridomas: Dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. **J. Immunol. Meth.** 32, 297-304.

Stöckel, K., Gagnon, C., Guroff, G. & Thoenen, H. (1976) Purification of nerve growth factor antibodies by affinity chromatography. **J. Neurochem.** 26, 1207-1211.

Stöckel, K., Schwab, M.E. & Thoenen, H. (1975) Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. **Brain Res.** 99, 1-16.

Suda, K., Barde, Y.-A. & Thoenen, H. (1978) Nerve growth factor in mouse and rat serum: Correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75, 4042-4046.

Thoenen, H. (1972) Surgical, immunological and chemical sympathectomy. In **Handbook of Experimental Pharmacology**, New Series, (Blaschke, H., Muscholl, E., eds.) Vol. 33, 813-844.

Thoenen, H. & Barde, Y.-A. (1980) Physiology of nerve growth factor. **Physiol. Rev.** 60, 1284-1335.

Tomita, J.T. & Varon, S. (1971) Preparation of antibodies to the three subunits of mouse 7S nerve growth factor. **Neurobiology** 1, 176-190.

Underwood, P.A., Kelly, J.F., Harman, D.F. & MacMillan, H.M. (1983) Use of protein A to remove immunoglobulins from serum in hybridoma culture media. **J. Immunol. Meth.** 60, 33-45.

Walker, P., Weichsel, M.E., Guo, S.M. & Fisher, D.A. (1980) Radioimmunoassay for mouse nerve growth factor (NGF). Effects of thyroxine administration on tissue NGF levels. **Brain Res.** 186, 331-341.

Walker, P., Weil, M.L., Weichsel, M.E. & Fisher, D.A. (1981) Effect of thyroxine on nerve growth factor concentration in neonatal mouse brain. **Life Sci.** 28, 1777-1787.

Wallenfels, K. & Weil, R. (1972) ß-Galactosidase. In **The Enzymes** (Boyer, P.D., ed.), third edn., Vol. 7, pp. 617-663, Academic Press, New York.

Weetall, H.H. (1970) Storage stability of water-insoluble enzymes covalently coupled to organic and inorganic carriers. **Biochim. Biophys. Acta** 212, 1-7.

Lebenslauf

Name	Sigrun Korsching
Eltern	Horst Korsching
	Lieselotte Korsching, geb. Kreutziger
24.6.1955	Geburt in Göttingen, Niedersachsen
1961-1965	Besuch der Volksschule in München
1965-1974	Besuch des Willi-Graf-Gymnasiums (math.-nat.) in München
1974	Abitur
1974-1980	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Wahlpflichtfach Biochemie)
1977	Diplomvorprüfung
1979	Diplomhauptprüfung
1979-1980	Diplomarbeit "Charakterisierung des Nerve Growth Factor-Rezeptors in chromaffinen Nebennierenmarkzellen des Rindes"
1980	Chemie-Diplom
1981-1983	Doktorarbeit im Labor von Prof. H. Thoenen am Max-Planck-Institut für Psychiatrie

Einige der in dieser Dissertation beschriebenen Ergebnisse wurden mit Zustimmung des Betreuers bereits veröffentlicht :

S.Korsching & H.Thoenen (1983) Proc.Natl.Acad.Sci. 80, 3513.
S.Korsching & H.Thoenen (1983) Neurosci. Lett. 39, 1.
H.Thoenen, S.Korsching, Y.-A. Barde & D.Edgar (1983) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48 (im Druck).